

**Aus der Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor Professor Dr. G. Ziemer**

Untersuchungen zur Biokompatibilität von in der Herzchirurgie relevanten Polymerkunststoffen

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Nils Hauser
aus
Tübingen**

2003

Dekan : Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter : Professor Dr. G. Ziemer

2. Berichterstatter : Professor Dr. W. Lindemann

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

1.0.0	Einleitung	7
1.1.0	Biokompatibilität	7
1.2.0	Zusammensetzung und Funktion des Organs Blut.....	7
1.3.0	Zelluläre und immunologische Bestandteile des Blutes.....	8
1.3.1	Erythrozyten.....	8
1.3.2	Leukozyten.....	9
1.3.3	Thrombozyten.....	9
1.3.4	Immunsystem.....	10
1.3.5	Zellen des Immunsystems	11
1.3.5.1	Granulozyten	11
1.3.5.2	Monozyten und Makrophagen	11
1.3.5.3	Lymphozyten	12
1.3.5.4	Kontakt zwischen Zellen und Werkstoffen	13
1.4.0	Gerinnung und Blutstillung	13
1.5.0	Blutreaktionen / Hämokompatibilität.....	15
1.5.1	Post-Perfusions-Syndrom (PPS)	15
1.6.0	Kunststoffe in der Medizin.....	16
1.6.1	Verwendung und Grund der Testung	16
1.6.2	Biokompatible Polymere	17
1.6.3	Übersicht über Biomaterialien aus Polymerkunststoffen.....	18
1.6.4	Vorstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kunststoffe... ..	19
1.6.4.1	Polyvinylchlorid (PVC).....	19
1.6.5	Beschichtungen von Fremdoberflächen.....	20
1.6.5.1	Beschichtungen von Fremdoberflächen.....	20
1.6.5.2	Heparinbeschichtung.....	21
1.6.5.3	Heparin	22
1.6.5.4	Medtronic – Carmeda Bioactive Surface® - Beschichtung.....	23
1.7.0	Antikörper zur Detektion von Aktivierungsmarkern.....	24
1.7.1	Verwendete Arten von Antikörpern.....	24
1.8.0	Markierung der Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen	25
1.9.0	Durchflußzytometrie	26
1.9.1	Einführung.....	26
1.9.2	Exzitation, Emission und Filter im Zusammenspiel	31
1.9.3	Kompensierung der Fluoreszenz.....	32
1.9.4	Datenauswertung und Gating	33
1.9.5	Auswertung der Ergebnisse.....	37
1.9.6	Datenverarbeitung / Qualitätssicherung der Daten	37
1.9.7	Besonderheiten des Coulter EPICS XL System II.....	38
1.10.0	Simulationsmodell für die extrakorporale Zirkulation	38
1.11.0	Hinführung zum Thema.....	38
1.11.1	Gegenstand der Arbeit.....	40
1.11.2	Laborchemische Analysemethoden	40
1.11.3	Welche Fragen sollte diese Arbeit beantworten ?	40
2.0.0	Material und Methoden	42
2.1.0	Übersicht des Versuchsablaufs.....	42
2.2.0	Probandenauswahl.....	43
2.3.0	Blutabnahmesystem.....	43
2.4.0	Chandler-Loop als Simulationsmodell für die extrakorporale Zirkulation	44
2.4.1	Aufbau und Anwendung als Simulationsmodell für die HLM	44

2.4.1.1	Chandler Loop I (ursprünglich).....	44
2.4.1.2	Chandler Loop II (modifiziert).....	46
2.4.1.3	Chandler-Loop III (erweitert).....	47
2.4.2	Die Loops (Ringe) des Chandler-Loops.....	48
2.4.4	Übergabe des Bluts in die Chandler-Loops.....	48
2.4.5	Einstellungen des Modifizierten Chandler-Loops während der Simulation einer extrakorporalen Zirkulation in vitro.....	49
2.4.6	Probenvorbereitung (Substratgewinnung) nach Chandler-Loop.....	49
2.5.0	Übersicht des Analysevorgangs.....	50
2.6.0	Vorbereitende Untersuchungen.....	50
2.7.0	Übersicht aller angewandten Tests.....	51
2.8.0	Vorstellung und Evaluation verschiedener Lyseverfahren für Vollblut	52
2.8.1	Vorbemerkungen.....	52
2.8.2	FACS Lysing Solution.....	52
2.8.2.1	Beschreibung des Tests und Funktionsprinzip.....	52
2.8.2.2	Methode.....	53
2.8.2.3	Messung.....	54
2.8.3	OptiLyse B.....	55
2.8.3.1	Beschreibung des Tests und Funktionsprinzip.....	55
2.8.3.2	Methode.....	56
2.8.4	OptiLyse C.....	56
2.8.4.1	Beschreibung des Tests und Funktionsprinzip.....	56
2.8.4.1.1	No-Wash-Methode.....	56
2.8.4.1.2	Wash-Methode.....	56
2.8.5	OthoMune Lysing Solution.....	57
2.8.5.1	Beschreibung des Tests und Funktionsprinzip.....	57
2.8.5.2	Methode.....	58
2.9.0	Methoden und Messungen der durchflußzytometrisch messbaren Aktivierungsmarker.....	58
2.9.1	CD11B.....	58
2.9.1.1	Eigenschaften des CD 11B-Antigens.....	58
2.9.1.2	Eigenschaften des CD11B-Antikörpers.....	59
2.9.1.3	CD 11B – Geräteeinstellung & Messung.....	60
2.9.2	CD11C.....	60
2.9.2.1	Eigenschaften des CD 11C-Antigens.....	60
2.9.2.2	Eigenschaften des CD 11C-Antikörpers.....	61
2.9.2.3	Markierung des Antikörpers für die Durchflußzytometrie.....	61
2.9.2.4	CD11C – Geräteeinstellung & Messung.....	61
2.9.3	CD18.....	62
2.9.3.1	Eigenschaften des CD18-Antigens.....	62
2.9.3.2	Eigenschaften des CD18-Antikörpers.....	63
2.9.3.3	Markierung des Antikörpers für die Durchflußzytometrie.....	64
2.9.3.4	CD18 – Geräteeinstellung & Messung.....	64
2.9.4	CD62L.....	65
2.9.4.1	Eigenschaften des CD62L-Antigens.....	65
2.9.4.2	Eigenschaften des CD62L-Antikörpers.....	66
2.9.4.3	Markierung des Antikörpers für die Durchflußzytometrie.....	66
2.9.4.4	CD62L – Geräteeinstellung & Messung.....	66
2.9.5	Gemeinsame Methode für die Oberflächen-Antikörper CD11B, CD11C, CD18 und CD 62L.....	67
2.9.6	CellProbe.....	70

2.9.6.1	Beschreibung und Funktionsprinzip intrazellulärer Enzymdiagnostik	70
2.9.6.2	FR – Kallikrein – Beschreibung des Testgegenstands	72
2.9.6.3	Oxidativer Burst – DCFH – PMA – – Beschreibung des Testgegenstands	74
2.9.6.4	Peroxides / DCFH – Beschreibung des Testgegenstands.....	75
2.9.6.5	AAPV – Elastase – Beschreibung des Testgegenstands	76
2.9.6.6	RGES – Elastase - – Beschreibung des Testgegenstands	77
2.9.7	CellProbe Methode.....	77
2.9.7.1	Vorbereitung der Proben – Herstellung einer Leukozytensuspension	77
2.9.7.2	CellProbe - Vorbereitung der CellProbe™-Reagenzien	79
2.9.7.3	CellProbe - Markierung der Leukozyten (WBC).....	79
2.9.7.4	CellProbe - Optionale Nachaktivierung der Proben vor Markierung mit CellProbe™-Reagenzien	80
2.9.7.5	CellProbe - Nachaktivierung mit PMA.....	81
2.9.7.6	CellProbe - Nachaktivierung mit FLMP	81
2.9.7.7	CellProbe - Nachaktivierung des Vollbluts durch Bebrütung und Stimulatoren.....	82
2.9.7.8	CellProbe - Nachaktivierung des Vollbluts durch Bebrütung und Stimulatoren nach Herstellung einer Leukozytensuspension	82
2.9.7.9	CellProbe - Durchflußzytometrische Messung	83
2.9.7.9.1	CellProbe - Standardisierung des Durchflußzytometers - FlowCheck™	83
2.9.7.9.2	CellProbe - FlowSet™-Fluorespheres	83
2.9.7.9.3	CellProbe - Messung.....	85
2.9.8	Interleukine	85
2.9.8.1	Interleukine - Testbeschreibung und Funktionsprinzip	85
2.9.8.2	Interleukin-1 β - Beschreibung	87
2.9.8.3	Interleukin 2 - Beschreibung.....	88
2.9.8.4	Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α) - Beschreibung.....	88
2.9.8.5	Interleukine – gemeinsame Methode IL-1 β ,IL-2,TNF- α	89
2.9.8.6	Interleukine - Durchflußzytometrische Messung	91
2.9.9.1	HeatShock – Hintergrund & Testbeschreibung.....	92
2.9.9.2	HeatShock - Eigenschaften des HSP70-Antigens	93
2.9.9.3	HeatShock - Eigenschaften des HSP70-Antikörpers.....	93
2.9.9.4	Einschleusung der HeatShock-Antikörper in die Zellen	94
2.9.9.5	Markierung des HSP70-Antikörpers mit PE-Sekundärantikörper	94
2.9.9.6	HeatShock - Methode.....	95
2.9.9.7	HeatShock – Geräteeinstellung & Messung	97
2.9.10	Thrombozyten	98
2.9.10.1	Bemerkungen zu Thrombozytenstudien	98
2.9.10.2	Verwendetes Substrat	98
2.9.10.3	Methode - PRP	99
2.9.10.5	CD 41-Markierung auf Thrombozyten	99
2.9.10.5.1	Beschreibung des Tests.....	99
2.9.10.5.2	Methode.....	100
2.9.10.6	Thrombozyten-Adhäsion an Leukozyten (CD41 positive Leukozyten)	101
2.9.10.6.1	Beschreibung des Tests.....	101
2.9.10.6.2	Methode.....	102

2.9.10.7	Fibrinogen-Leukozyten-Aggregation	102
2.9.10.7.1	Monoklonaler Fibrinogen-Antikörper mit Sekundärmarkierung	102
2.9.10.7.1.1	Beschreibung des Tests	102
2.9.10.7.1.2	Methode	103
2.9.10.7.2	Polyklonaler Fibrinogen-Antikörper mit Sekundärmarkierung	104
2.9.10.7.2.1	Beschreibung des Tests	104
2.9.10.7.2.2	Methode	104
2.9.10.7.3	Fibrin-Adhäsion an Thrombozyten	105
2.9.10.7.3.1	Beschreibung des Test	105
2.9.10.7.3.2	Methode	105
2.9.10.7.4	CD62P-Adhäsion auf Thrombozyten	106
2.9.10.7.5	Beschreibung des Tests	106
2.9.10.7.5.1	Methode	106
2.10.0	Zellzahlen	107
2.10.1	Beschreibung des Tests	107
2.10.2	Methode	107
2.11.0	Humorale Marker	107
2.11.1	TAT-micro Assay (Enzymimmunotest zur Bestimmung von Human- Thrombin/AT-III-Komplex)	108
2.11.1.1	Beschreibung des Tests	108
2.11.1.2	Methode	108
2.11.1.3	Testauswertung	109
2.11.2	PMN-Elastase	109
2.11.2.1	Beschreibung des Tests	109
2.11.2.2	Methode	111
2.11.2.3	Testauswertung	111
2.11.3	β -TG (Enzymimmunologischer in-vitro Test zur quantitativen Bestimmung von β -Thromboglobulin)	112
2.11.3.1	Beschreibung des Tests	112
2.11.3.2	Methode	112
2.11.3.3	Testauswertung	113
2.11.4	Enzymgnost F 1+2 micro (Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Human-Prothrombinfragment 1+2)	114
2.11.4.1	Beschreibung des Tests	114
2.11.4.2	Methode	114
2.11.4.3	Auswertung	115
2.11.5	SC5b-9	115
2.11.5.1	Beschreibung des Tests	115
2.11.5.2	Methode	116
2.11.5.3	Auswertung	116
2.12.0	Statistische Auswertung	117
2.13.0	Auflistung aller Labormaterialien	117
3.0.0	Ergebnisse	119
3.1.0	Vergleich verschiedener Lyseverfahren	119
3.1.1	Ergebnisse Becton-Dickinson FACS Lysing Solution	119
3.1.1.1	FACS-Lyselösung bei Raumtemperatur	119
3.1.1.2	FACS-Lyselösung komplett auf Eis (1)	119
3.1.1.3	FACS-Lyselösung komplett auf Eis (2)	119
3.1.2	Ergebnisse Coulter OptiLyse B	120
3.1.2.1	OptiLyse B bei Raumtemperatur	120

3.1.2.2	OptiLyse B bei Raumtemperatur + 1 Wäsche.....	120
3.1.2.3	OptiLyse B auf Eis	120
3.1.2.4	OptiLyse B auf Eis + Wäsche.....	120
3.1.2.5	Ergebnisse OrthoMune Lysing Solution.....	121
3.1.2.6	Bewertung der Lyseverfahren	121
3.2.0	Durchflusszytometrische Bestimmungen	121
3.2.1	Oberflächenantigene CD11B, CD11C, CD18, CD62L	121
3.2.1.1	Optische Demonstration der Messergebnisse	121
3.2.1.2	CD 11B	123
3.2.1.3	CD 11C	127
3.2.1.4	CD 18.....	131
3.2.1.5	CD 62L.....	135
3.2.2	CellProbe	139
3.2.2.1	Leerwerte und Negative Staining / Kallibrierung	139
3.2.2.2	Oxidativer Burst	140
3.2.2.2.1	Ergebnisse optisch	140
3.2.2.2.2	Ergebnisse Oxidativer Burst.....	141
3.2.2.2.3	Oxidativer Burst mit PMA-Nachaktivierung.....	144
3.2.2.2.4	Oxidativer Burst mit FMLP-Nachaktivierung.....	148
3.2.2.3	Kallikrein	152
3.2.2.3.1	Ergebnisse optisch	152
3.2.2.3.2	Ergebnisse Kallikrein 129min Chandler-Loop.....	153
3.2.2.3.3	Kallikrein 120min ChandlerLoop mit PMA-Nachaktivierung	157
3.2.2.3.4	Kallikrein 120min Chandler-Loop mit FMLP-Nachaktivierung .	161
3.2.2.3.5	Kallikrein 120min ChandlerLoop mit 5 Stunden Nachbebrütung ...	164
3.2.2.4	Ergebnisse RGEs-Elastase	168
3.2.2.5	Ergebnisse AAPV-Elastase.....	172
3.2.2.6	Ergebnisse Peroxide	176
3.2.3	Interleukine	181
3.2.3.1	Ergebnisse Interleukin1 β	181
3.2.3.2	Ergebnisse Interleukin 2	185
3.2.3.3	Ergebnisse TNF- α	189
3.2.4	HeatShock	193
3.2.4.1	Meßergebnisse optisch	193
3.2.4.2	Ergebnisse HeatShock.....	194
3.2.5	Thrombozytenstudien	200
3.2.5.1	CD41 FITC an Thrombozyten	200
3.2.5.2	Thrombozytenadhäsion an Leukozyten	201
3.2.5.3	Fibrinogenadhäsion an Leukozyten (monoklonaler Antikörper)..	204
3.2.5.4	Fibrinogenadhäsion an Leukozyten (polyklonaler Antikörper)....	206
3.2.5.5	Fibrin-Adhäsion an Thrombozyten	209
3.2.5.6	CD 62P auf Thrombozyten	210
3.3.0	Zellzahlen	212
3.3.1	Thrombozytenzahl	212
3.3.2	Erythrozytenzahl	213
3.3.3	Leukozytenzahl.....	214
3.4.0	Humorale Marker.....	215
3.4.1	β -Thromboglobulin.....	215
3.4.2	PNM-Elastase	216
3.4.3	SC5b-9 – Komplement	217

3.4.4	Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT).....	218
3.4.5	Prothrombinfragment F1+2.....	219
4.0.0	Diskussion	221
4.1.0	Extrakorporale Zirkulation und Biokompatibilität.....	221
4.2.0	Durchflußzytometrische Marker.....	229
4.2.1	Oberflächenantigene CD11B, CD11C, CD18 und CD62L.....	229
4.2.2	Intrazelluläre Enzymbestimmungen.....	234
4.2.2.1	Oxidativer Burst.....	235
4.2.2.2	Kallikrein.....	239
4.2.2.3	Peroxide.....	244
4.2.2.4	Elastase.....	246
4.2.2.4.1	RGES-Elastase.....	246
4.2.2.4.2	AAPV-Elastase.....	246
4.2.2.4.3	Zusammenfassung Elastase.....	247
4.2.3	Interleukine IL1- β , IL-2, TNF- α	248
4.2.3.1	Interleukin 1.....	248
4.2.3.2	Interleukin 2.....	249
4.2.3.3	Tumor-Nekrose-Faktor- α	250
4.2.3.4	Bedeutung der Zytokine.....	250
4.2.4	Heat Shock Protein HSP 70.....	252
4.2.5	Thrombozytenstudien.....	254
4.2.5.1	CD41-Markierung aus Thrombozyten.....	254
4.2.5.2	Thrombozytenadhäsion an Leukozyten.....	255
4.2.5.3	Fibrinogenadhäsion an Leukozyten.....	255
4.2.5.3.1	Monoklonaler Fibrinogen-Antikörper.....	255
4.2.5.3.2	Polyklonaler Fibrinogen-Antikörper.....	255
4.2.5.4	Fibrin-Adhäsion an Thrombozyten.....	256
4.2.5.5	CD62P-Markierung auf Thrombozyten.....	256
4.2.5.6	Zusammenfassung der Thrombozytenstudien.....	257
4.3.0	Lysemethoden.....	258
4.4.0	Zellzahlen.....	260
4.4.1	Zusammenfassung der Zellzahlen.....	261
4.5.0	Humorale Marker.....	262
4.5.1	β -Thromboglobulin.....	262
4.5.2	PNM-Elastase.....	263
4.5.3	SC5b-9 – Komplement (TCC – Terminal Complement Complex).....	264
4.5.4	Gerinnungsmarker.....	265
4.5.4.1	Thrombin-Antithrombin-Komplex.....	265
4.5.4.2	Prothrombinfragment F1+2.....	266
5.0.0	Zusammenfassung	268
6.0.0	Abstract	275
7.0.0	Literaturverzeichnis	276

1.0.0 Einleitung

1.1.0 Biokompatibilität

Unter Biokompatibilität wird die Verträglichkeit zwischen einem technischen und einem biologischen System verstanden. Sie gliedert sich in die Strukturkompatibilität und die Oberflächenkompatibilität. Diese Definition folgt zum einen der Bedeutung des Wortes Biokompatibilität, zum anderen entspricht sie der klinischen Erfahrung, an der sich jede neue Technologie zur Schaffung biokompatibler Werkstoffe und Bauteile messen lassen muss. Der Begriff Strukturkompatibilität beschreibt hingegen die Anpassung der Implantatbeschaffenheit an das mechanische Verhalten des Empfängergewebes und umfasst sowohl die Formgebung als auch die „innere Struktur“ (z.B. die Ausrichtung von Fasern in polymeren Werkstoffen). Hierbei wird ein weitgehendes Struktur-Mimikry (Strukturimitation) angestrebt. Für die vorliegende Arbeit ist der Begriff der Oberflächenkompatibilität wichtiger zu bewerten. Die Oberflächenkompatibilität ist beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine für die auf das Blut einwirkenden Einflüsse von unmittelbarer Bedeutung. Als ideale Oberflächenkompatibilität versteht man die optimale Anpassung der chemischen, physikalischen, biologischen und morphologischen Oberflächeneigenschaften des Implantats an das Empfängergewebe, bzw. das Blut mit dem Ziel einer klinisch erwünschten oder unerwünschten Wechselwirkung. Ein „chirurgisches Instrument“ wie die Herz-Lungen-Maschine, das während der Operation im bzw. außerhalb des Körpers eingesetzt wird, zählt zu den Ultra-Kurzzeitimplantaten und es ist äußerst wichtig auch für diese kurze Zeitdauer der Operation Aspekte der Biokompatibilität zu berücksichtigen.

Die Biokompatibilität wird dabei unter anderem in die Teilbereiche Zyto- und Hämokompatibilität unterteilt. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich hierbei auf die Hämokompatibilität mit Schwerpunkt auf der Evaluation der Interaktion zwischen der Fremdoberfläche und den Zellen des Bluts, sowie der Beobachtung der plasmatischen Vorgänge.

1.2.0 Zusammensetzung und Funktion des Organs Blut

Das Blut zirkuliert in einem System von Blutgefäßen und erfüllt dabei wesentliche Transportaufgaben im Organismus. Hauptfunktionen des Blutes sind die

Stoffversorgung und -entsorgung der Zellen (Sauerstoff, CO₂, Nährstoffe, Stoffwechselprodukte, etc.), der Transport von Hormonen und die Regulation der Körpertemperatur. Das Blut besteht zu 40 - 45 % aus zellulären Bestandteilen und zu 55 - 60% aus dem Blutplasma. Die Gesamtmenge beträgt beim erwachsenen Menschen etwa 5 bis 6 Liter, was 7 - 8% des Körpergewichtes entspricht. Aufgrund seiner zahlreichen Aufgaben wird das Blut oft als „fließendes Organ“ bezeichnet. Das Blutplasma besteht zu rund aus 90 Vol.% Wasser und zu 10 Vol.% aus Elektrolyten, gelösten Gasen, Proteinen (Albumine, Globuline) und Stoffwechselprodukten. Die annähernd gleich bleibende Zusammensetzung dieser Blutbestandteile gewährleistet u.a. einen relativ konstanten osmotischen Druck und pH-Wert.

Bei Verletzungen der Blutgefäßwand findet neben der primären Blutstillung durch die Blutplättchen ein plasmatischer Gerinnungsvorgang statt. Dabei bildet sich der Blutfaserstoff Fibrin aus einer im Blutplasma gelösten Vorstufe, dem monomeren Fibrinogen, welches im Verlauf mit anderen Substanzen zu festen Polymeren umgewandelt wird. Plasma enthält rund 0.3% Fibrinogen. Plasma ohne Fibrinogen wird als Serum bezeichnet. Das Fibrin bildet ein Netzwerk, in dem sich Blutkörperchen verfangen und den Thrombus bilden. Durch Zentrifugation lässt sich Blut in Plasma und Blutkörperchen trennen. Der prozentuale Anteil aller Blutkörperchen wird dabei als Hämatokrit bezeichnet. Auf die weitreichenden Folgen einer artifiziell angestoßenen Gerinnung durch Kunststoffoberflächen wird in folgenden Kapiteln eingegangen.

1.3.0 Zelluläre und immunologische Bestandteile des Blutes

1.3.1 Erythrozyten

Unter den festen Bestandteilen des Blutes kommen die Erythrozyten (rote Blutkörperchen) am häufigsten vor. Ihre Hauptfunktion liegt im Transport von Sauerstoff und dem CO₂-Austausch. Erythrozyten haben ihren Zellkern im Laufe der Entwicklung verloren - sie haben daher die Form von bikonkaven Scheiben mit einem mittleren Durchmesser von 7 nm. Die bikonkave Form verleiht eine Oberflächenvergrößerung und somit für eine verbesserte Gasaufnahme und -abgabe. Wesentlicher Bestandteil der Erythrozyten ist das Hämoglobin (Hb), das den Sauerstofftransport im Organismus gewährleistet. Der durchschnittliche Hb-Gehalt

eines einzelnen Erythrozyten beträgt 30 pg (oder 1.86 fmol). Erythrozyten werden in der Regel bei durchflußzytometrischen Bestimmungen durch Lyse entfernt, um eine Beobachtung der anderen Zellreihen zu ermöglichen. Durch ihre Größe würden sie dies bei Messungen im Vollblut verhindern. Die Lyse der Erythrozyten stellt bei durchflußzytometrischen Messungen gewissermaßen eine Achillessehne dar.

1.3.2 Leukozyten

Leukozyten (weiße Blutkörperchen, white blood cells (WBC)) sind hauptsächlich für Abwehrvorgänge im Organismus verantwortlich. Sie stellen keine einheitliche Population dar, wobei sich fünf Leukozytentypen differenzieren lassen. Dichtgranulierte Zellen werden als Granulozyten bezeichnet, wobei je nach Anfärbbarkeit ihrer Granula durch saure, bzw. basische Farbstoffe zwischen neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten unterschieden wird. Nach der Kernmorphologie erfolgt die Unterteilung in polymorphonukleäre und mononukleäre Leukozyten. Aufgrund der unregelmäßig gestalteten Kerne werden ausgereifte Granulozyten als polymorphonukleäre Leukozyten bezeichnet, während Monozyten und Lymphozyten als mononukleäre Leukozyten benannt werden. Durchflußzytometrisch können Leukozyten anhand ihrer Größe und Oberflächenbeschaffenheit differenziert werden. Die Hauptbildungsstätten von Leukozyten sind die Lymphknoten und das Knochenmark. Die Zahl der Leukozyten im Blut ist geringer als die der Erythrozyten, sie beträgt beim gesunden Erwachsenen 4000 - 10000 pro μL . Die Leukozyten benutzen die Blutgefäße hauptsächlich als Transportsystem vom Bildungsort zum Ort ihrer Funktion. Ein großer Teil der Leukozyten hält sich in den Geweben auf, da sie maßgeblich am Gewebeaufbau, der Phagozytose und an der Bildung von Antikörpern beteiligt sind. Leukozyten stellen bei durchflußzytometrischen Untersuchungen die Hauptzielzellen dar. Ihre Subpopulationen werden meist getrennt beobachtet.

1.3.3 Thrombozyten

Thrombozyten (Blutplättchen, Platelets) sind kernlose, scheibenförmige Zellfragmente mit einem Durchmesser von 2 - 5 μm , die als Abschnürungen großer, vielkerniger Megakaryozyten des Knochenmarks entstehen. Im Mittel zirkulieren

rund 250000 Thrombozyten/ μ l im peripheren Blut. Die Thrombozyten dienen der Blutstillung und -gerinnung. Gleichzeitig mit der Thrombozytenaktivierung werden plasmatischen Gerinnungsvorgänge eingeleitet, als deren Endprodukt Thrombin entsteht, welches Fibrinogen in Fibrin überführt und zusammen mit den aktivierten Thrombozyten den eigentlichen Thrombus bildet.

Der Kontakt der Thrombozyten mit artifiziellen Oberflächen verursacht eine Aktivierung und kann über die Bildung von Aggregaten zur Thrombopenie im Sinne eines Verbrauchs führen. Die Aggregatbildung hat einen positiven Effekt auf die weitere Aggregation durch Freisetzung von vasoaktiven Aminen (Bsp. Serotonin). Die Bildung der Aggregate ist in zweierlei Hinsicht bedeutsam. Es kann zu Gerinnungsstörungen durch die Thrombozytopenie, aber auch zu Mikroembolien mit Folgen in unterschiedlichen Organsystemen kommen (16) (siehe Kap. Post-Perfusions-Syndrome).

1.3.4 Immunsystem

Fremdstoffe, wie Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten oder auch Werkstoffe, die in den menschlichen Organismus eingedrungen, durch Implantation eingebracht oder auf innere und äußere Oberflächen des Körpers aufgebracht sind, können durch das Immunsystem erkannt werden. Hierbei spielen sowohl humorale, wie auch zelluläre Immunreaktionen eine wichtige Rolle. Bei der humoralen Immunreaktion wird der Fremdkörper durch im Plasma vorhandene Immunglobuline, die nach Kontakt mit einem Antigen von Plasmazellen als Antikörper produziert werden, inaktiviert oder der Phagozytose zugeführt. Bei der zellvermittelten Immunreaktion erkennen die Zellen des Immunsystems die körperfremde Oberfläche und reagieren darauf mit der Synthese von Antikörpern. Zudem können bestimmte körpereigene Zellen, wie z.B. Tumorzellen, als verändert erkannt und eliminiert werden. Für die unspezifische angeborene Abwehr von Fremdstoffen und die Vernichtung von körpereigenen Stoffen, wie z.B. Zellrümmern, sind vor allem neutrophile Granulozyten (im zirkulierenden Blut) und die Makrophagen (in den Geweben) verantwortlich. Wird die unspezifische Abwehr überfordert, z.B. durch Bakterien, die in der Lage sind, Granulozyten abzutöten, wird das spezifische Abwehrsystem wirksam. Die spezifische erworbene Abwehr einer fremden Substanz, dem Antigen, geht vor allem auf das Zusammenarbeiten der verschiedenen Typen von Lymphozyten und von

ihnen abstammenden Abwehrstoffen zurück. Die Abwehrvorgänge bei der erworbenen Abwehr können sowohl zellulär als auch humoral sein

1.3.5 Zellen des Immunsystems

1.3.5.1 Granulozyten

Granulozyten sind die im Blut vorherrschenden Leukozyten. Sie stehen rasch und in großer Anzahl an einem Infektionsort zur Verfügung, ihre Lebensdauer ist jedoch relativ kurz (Tage). Sie sind charakterisiert durch mehrfach segmentierte Zellkerne und kleine Granula. Es wird zwischen neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten unterschieden. Die neutrophilen Granulozyten machen den größten Anteil der Granulozyten im Blut aus und ihre Hauptaufgabe besteht in der Phagozytose und die Zerstörung von Bakterien, Fremdkörpern und Zelltrümmern. Hierzu sind in den Granula verschiedene Enzyme wie z.B. Säuredehydrogenasen, Peroxidasen, Lysozym und Proteasen eingelagert. Die neutrophilen Granulozyten zeigen eine starke amöboide Beweglichkeit. Sie wandern als erste Zellen der zellulären Abwehr aus dem Blut an den Ort der Schädigung, wo sie phagozytoseaktiv werden und danach absterben. Eosinophilen Granulozyten sind sehr phagozytoseaktiv und bewegen sich ebenfalls amöboid. Ihre Zahl erhöht sich bei allergischen Reaktionen, Autoimmunerkrankungen und Parasitenbefall. Der Anteil an basophilen Granulozyten im Blut ist sehr gering. Sie enthalten Histamin, Heparin, Proteasen und Hydrolasen, die bei allergischen Sofortreaktionen freigesetzt werden.

1.3.5.2 Monozyten und Makrophagen

Nach der ersten Angriffswelle der Granulozyten übernehmen mobile Makrophagen, die von den im Blut zirkulierenden Monozyten abstammen, die weitere Abwehr. Im Vergleich zu den Granulozyten weisen die Makrophagen eine längere Lebensdauer auf, und sie sind über längere Zeit zur Synthese (z.B. von Enzymen), zur Sekretion (spezielle Serumproteine / Komplement) fähig. Neben den im Blut zirkulierenden Monozyten / Makrophagen finden sich ortsständige Makrophagen, wie z.B. im Gehirn (Mikrogliazellen), Lymphknoten, Lungenalveolen, Milz, Gelenkspalten oder in der Leber (von Kupffer'sche Sternzellen), die zum

mononukleären Phagozytosesystem zusammengefasst werden. Die Hauptaufgaben der Makrophagen liegen in der Bekämpfung von Bakterien, Viren und anderer antigen wirkender Substanzen, durch deren Aufnahme, anschließende Resorption sowie Inaktivierung durch Enzyme wie z.B. Säurehydrolasen und Peroxidasen, oder reaktive Sauerstoffverbindungen wie z.B. Wasserstoffperoxid. Monozyten und Makrophagen besitzen verschiedene Rezeptoren an ihrer Oberfläche für die Anlagerung von biologischen und synthetischen Fremdkörpern.

1.3.5.3 Lymphozyten

Die Lymphozyten entstammen dem Knochenmark und wandern als Vorläuferzellen in verschiedene Gewebe, wo sie zu immunkompetenten (d.h. zu einer spezifischen Immunreaktion befähigten) Zellen geprägt werden. Als Zellen der humoralen Abwehr sind die B-Lymphozyten (sie stammen aus dem Knochenmark, „B“ = „bone marrow“) darauf programmiert, jeweils eine einzige Art von Antikörpern (Immunglobuline) zu bilden und sie als Rezeptoren auf ihre Zelloberfläche „abzulagern“. Wenn Antigene und Rezeptoren zu einander passen, erfolgt eine Bindung. Hierdurch werden Lymphozyten aktiviert und zu B-Effektorzellen (Plasmazellen) und B-Gedächtniszellen differenziert. Die B-Effektorzellen produzieren in der Folge Antikörper. Die langlebigen B-Gedächtniszellen sind für die Wiedererkennung verantwortlich: sie können bei einem späteren Kontakt mit denselben Antigenen beschleunigt reagieren. Neben den B-Lymphozyten sind die T-Lymphozyten, die in der Thymusdrüse geprägt werden, für die zelluläre Abwehr zuständig. Ihre Aufgabe ist die Vernichtung von mit Mikroorganismen infizierten oder geschädigten körpereigenen Zellen. Sie reagieren nur auf zellgebundene Antigene. Die T-Lymphozyten müssen daher nicht nur Antigene, sondern auch Oberflächenmarker der körpereigenen Zellen erkennen. Diese Zellmarker werden als Haupthistokompatibilitätskomplex bezeichnet (major histocompatibility complex, MHC). Sie wurden im Zusammenhang mit starken Abstoßungsreaktionen, wie sie nach Transplantationen vorkommen können, beobachtet.

1.3.5.4 Kontakt zwischen Zellen und Werkstoffen

Analog zu jedem Lebewesen, das existenziell in einem Abhängigkeitsverhältnis zu seiner Umwelt steht, sind auch Zellen nicht in der Lage, ohne Kontakt zu ihrer Umwelt zu überleben. Auf allen Stufen der Organisation, vom Gesamtorganismus bis zur Einzelzelle, sind Überlebensstrategien erkennbar, die sowohl vom Bestreben die eigene Integrität gegenüber der Außenwelt aufrechtzuerhalten als auch von den Bemühungen, sich an die gegebenen Veränderungen möglichst effizient anzupassen, geprägt sind. Ein Extremfall der zellulären Reaktionen ist sicherlich die Apoptose als programmierter Zelltod. Komplexe interzelluläre Kontaktstrukturen und Rezeptor-Liganden-Systeme dienen den Zellen zur Kommunikation mit der unmittelbaren und entfernten Umgebung und regulieren Funktion und Verhalten. Die Ausbildung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche bei Einfluß von Stressfaktoren im Sinne einer Aktivierung gegenüber Fremdoberflächen ermöglicht, die Vorgänge sowohl qualitativ als auch quantitativ zu untersuchen. Adhäsionsproteine und Moleküle der extrazellulären Matrix beeinflussen die Anheftung der Zellen an einem Substrat, die Zellwanderung, die Zellmorphologie, sowie Differenzierung und Teilungsaktivität. Die strukturelle, physikalische oder chemische Veränderung der Umgebung von Zellen kann also entscheidenden Einfluß auf die verschiedensten Zellfunktionen ausüben. Bei der Evaluation von Werkstoffen, welche in Kontakt mit einem biologischen System gebracht werden sollen, ist es daher sinnvoll, nicht nur seine Wechselwirkungen mit dem betroffenen Organ als ganzes, sondern auch mit den einzelnen Zellen, die in direkter Verbindung mit dem Werkstoff stehen, zu untersuchen.

1.4.0 Gerinnung und Blutstillung

Blutungen aus der Eröffnung kleiner Gefäße werden durch die primäre Hämostase normalerweise innerhalb von Minuten beendet. Diese kommt durch Vasokonstriktion und Bildung eines Thrombozytenpfopfs zustande. An den Bindegewebsfasern der Wundränder bleiben Thrombozyten unter Vermittlung durch von-Willebrand-Faktor (vWF) haften. Der vWF wird als oligomeres Glykoprotein subendothelial und in Plättchen gefunden, außerdem im Plasma, wo er den Faktor VII gebunden hält. Er

vermittelt die Ausbildung von Brücken zwischen Endothel und dem Ib-Rezeptor der Thrombozytenmembran. Mit einer Umformung der Thrombozyten wird unter ADP-Einfluss die vorerst reversible Aggregation eingeleitet, wobei die ADP-Wirkung durch Kollagen, Adrenalin und den plättchenaktivierenden Faktor (PAF) verstärkt wird. Die beginnende Thromboxansynthese leitet mit der Bildung von Thrombin zeitgleich die irreversible Gerinnung ein. Thrombin bewirkt hierbei über die Aktivierung der Zyklooxygenase die Freisetzung weiterer Endoperoxide (PGG_2 , PGH_2) und Thromboxan A und B mit der Folge weiterer Aggregationen von Thrombozyten und Freisetzung von Thrombozyteninhaltsstoffen (Serotonin, ADP). Fibrinogen reagiert mit den Glykoproteinen IIb und IIIa der Thrombozytenmembran und leitet die Verknüpfung der Plättchen ein. Eine Ausweitung der Aggregation wird durch Freisetzung von Prostazyklin und Freisetzung von cAMP auf gesundem Endothel verhindert. Der Beginn der Aktivierungsreaktion kann weiterhin in den extrinsischen, über vom Endothel freigesetzten Tissue Factor (Gewebsthromboplastin), und den intrinsischen Weg über Aktivierung von Faktor XII unterschieden werden. Für die Hämokompatibilitätstestung ist der Aktivierungsgrad über den intrinsischen Weg von besonderem Interesse. Er kann beispielsweise über den Kontakt des Bluts mit Glasoberflächen ausgelöst werden. Weiterhin sind an der Aktivierung hochmolekulares Kininogen und proteolytische Enzyme wie Kallikrein, Thrombin oder Trypsin beteiligt. Als Folge werden die Faktoren XI und IX aktiviert, wobei Faktor IXa gemeinsam mit Plättchenfaktor 3 und Ca^{2+} -Ionen einen Enzymkomplex bildet, der die Aktivierung von Faktor X zur Folge hat.

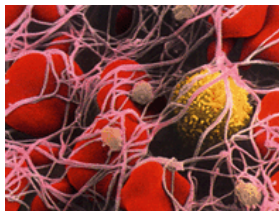


Abb. 1.1 : Fibrinvernetzte Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten

1.5.0 Blutreaktionen / Hämokompatibilität

Die Interaktion zwischen Blutkomponenten und Implantat ist wichtig für seine Biofunktionalität. Beim ersten Kontakt zwischen Blut und Implantat adsorbieren Proteine aus dem Blut auf der Implantatoberfläche. Anschließend adhären Blutplättchen und andere Zellen. Hämokompatible Werkstoffe sollten keine Blutkoagulation, Änderung der Plasmaproteine des Blutes oder Verringerung der Elektrolytenkonzentration hervorrufen. In vivo sind Implantate ständig dem Blutstrom ausgesetzt und die Verwendung von dynamischen Testsystemen erlaubt dabei die Untersuchung der Interaktion zwischen Werkstoff und Blut unter Flussbedingungen und simulierten klinischen Konditionen. Die Adhäsion von Blutplättchen und Änderungen ihrer Morphologie unter kontrollierten Bedingungen ist damit ein oft untersuchter Parameter.

1.5.1 Post-Perfusions-Syndrom (PPS)

Ein Beispiel für die Folgen der Interaktion der Fremdoberfläche mit den Zellen des Bluts und somit der extrakorporalen Zirkulation als Auslöser eines pathophysiologischen und pathoimmunologischen Vorgangs ist das sogenannte Post-Perfusions-Syndrom, das im angelsächsischen Sprachgebrauch auch als Post-Pump-Syndrom bezeichnet wird. Auf einen prolongierten, aber auch einen kurzzeitigen Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (EKZ) kann hierbei eine systemische inflammatorische Reaktion (SIRS – systemic inflammatory response syndrome) des Patienten folgen. Als passagerer oder andauernder Zustand mit Zeichen einer Multiorganfunktionseinschränkung verzögert das PPS die Rehabilitation und Genesung des Patienten, wobei die Multiorgandysfunktion durch folgende Merkmale/Symptome gekennzeichnet sein kann

- Fieber ohne infektiöse Ursache
- Neurologische Veränderungen
- Lungendysfunktion
- Nierendysfunktion
- Blutungsneigung

Häufig wird ein zwei bis drei Tage andauerndes postoperatives Fieber beobachtet. Für den Patienten kann eine belastende intensive Therapie die Folge sein, in deren Rahmen Langzeitintubation, Dialyse und wiederholte Austauschtransfusionen indiziert sein können. Die Ursache der Organschädigungen wird heute sowohl in der Möglichkeit der Bildung von Mikrothromben während des EKZ-Einsatzes mit konsekutiven Mikroembolien, als auch in der Freisetzung von zellschädigenden Stoffen wie Endotoxine und Zytokine gesehen, wobei sich Vergleiche zum SIRS bei längerdauernder, künstlicher Beatmung ziehen lassen. Auch hier scheint das Ausmaß der Erkrankung mit der Quantität der inflammatorischen Transmitterstoffe zu korrelieren (Interleukin-1beta, TNF-alpha, Interleukin-6, Interleukin-12). Weiterhin werden belastende Stoffwechsellustände und der nicht pulsatile Blutfluss durch die mechanischen Anteile der Herz-Lungen-Maschine (Rollerpumpen) als Ursachen herangezogen.

1.6.0 Kunststoffe in der Medizin

1.6.1 Verwendung und Grund der Testung

Im Bezug auf die Biokompatibilität wird geprüft, ob das Material für den Einsatz in medizinischen Geräten z.B. Herz-Lungen-Maschine, Dialysatoren, Laparoscopen zur Untersuchung der Bauchhöhle oder Kathetern für die Diagnose und Therapie verwendbar ist. Dafür sind Kunststoffe nur dann geeignet, wenn sie das Blut, mit dem sie in Berührung kommen, weder chemisch noch mechanisch beeinflussen.

Einer Störung des Gleichgewichts der Hämostase durch die Oberfläche können teilweise schwerwiegende Nachteile für den Patienten, sowie technische Schwierigkeiten während des Einsatzes technischer Instrumente und Geräte nachfolgen, die wiederum eine Gefährdung des Patienten zur Folge haben können (Thrombosierungen auf Membranen der Oxygenatoren, Verschlüsse von Schlauchsystemen). Von Anfang 1993 bis Anfang 1996 wurden mehrere Hundert verschiedene Polymertypen auf ihre Zell- und Blutverträglichkeit untersucht und bewertet.

1.6.2 Biokompatible Polymere

Der klinische Einsatz von synthetischen Polymeren begann in den 60-er Jahren in Form von Einwegartikeln, wie beispielsweise Spritzen und Kathetern, vor allem aufgrund der Tatsache, dass Infektionen infolge nicht ausreichender Sterilität der wiederverwendbaren Artikel aus Glas und metallischen Werkstoffen durch den Einsatz von sterilen Einwegartikeln signifikant reduziert werden konnten [50]. Die Einführung der medizinischen Einwegartikel aus Kunststoffen erfolgte somit nicht nur aus ökonomischen, sondern auch aus hygienischen Gründen. Wegen der steigenden Anzahl synthetischer Polymere und dem zunehmenden Bedarf an ärztlicher Versorgung reicht die Anwendung von Kunststoffen in der Medizin von preisgünstigen Einwegartikeln, die nur kurzzeitig intrakorporal eingesetzt werden, bis hin zu Implantaten, die über eine längere Zeit großen Beanspruchungen im menschlichen Körper unterworfen sind. Die steigende Verbreitung von klinisch eingesetzten Kunststoffen ist auf ihre einfache und preisgünstige Verarbeitbarkeit in eine Vielzahl von Formen und Geometrien sowie auf ihr breites Eigenschaftsspektrum zurückzuführen. Kunststoffe werden daher in fast allen medizinischen Bereichen eingesetzt.

Kunststoffe für medizinische Anwendungen müssen eine Reihe von Anforderungen erfüllen: Toxizität, Mutagenität, Biokompatibilität, Prozessierbarkeit mit konventionellen Herstellungsmethoden, genügende mechanische Eigenschaften, Sterilisierbarkeit und Langzeitstabilität in vivo sind wichtige Faktoren für den klinischen Einsatz. Zudem sollten biokompatible Polymere je nach Anwendung möglichst gering mit Additiven, wie beispielsweise Weichmachern, Antioxidantien oder Stabilisatoren versetzt sein. Die Lebensmittelgesetze schreiben hierbei Art und Höchstmenge solcher Additive für in Frage kommende Polymere vor. So genannte „medical-grade“ Polymere können einen erheblichen Gehalt an Additiven aufweisen. Der Weichmacheranteil in PVC kann bis zu 50% betragen. Der Terminus „medical-grade“ weist darauf hin, dass die enthaltenen Additive bestimmte medizinische Anforderungen erfüllen und die Werkstoffproduktion unter Reinraumbedingungen erfolgte

1.6.3 Übersicht über Biomaterialien aus Polymerkunststoffen

Polymer	Anwendung
Polyethylen (PE)	Gelenkpfanne für Hüftgelenkendoprothese, künstliche Knieprothesen, Sehnen- und Bänderersatz, Spritzen, Katheterschläuche, Verpackungsmaterial
Polypropylen (PP)	Komponenten für Blutoxygenatoren und Nierendialyse, Fingergelenk-Prothesen, Herzklappen, Nahtmaterial, Einweg Spritzen, Verpackungsmaterial, Polyethylenterephthalat, Künstliche Blutgefäße, Sehnen- und Bänderersatz, Dialysemembranen
Polyvinylchlorid (PVC)	Extrakorporale Blutschläuche, Blutbeutel und Beute für Lösungen für intravenöse Anwendungen, Einwegartikel
Polycarbonat (PC)	Komponenten für Dialysegeräte, unzerbrechliche, sterile Flaschen, Spritzen, Schläuche, Verpackungsmaterial
Polyamide (PA)	Nahtmaterial, Katheterschläuche, Komponenten für Dialysegeräte, Spritzen, Herzmitralklappen
Polytetrafluorethylen (PTFE)	Gefäßimplantate
Polymethylmethacrylat (PMMA)	Knochenzement, Intraokulare Linsen und harte Kontaktlinsen, künstliche Zähne, Zahnfüllmaterial
Polyurethan (PU)	Künstliche Blutgefäße und Blutgefäßbeschichtungen, Hautimplantate, künstliche Herzklappen, Dialysemembranen, Entschäumer Infusionsschläuche, Schlauchpumpen
Polysiloxane	Brustimplantate, künstliche Sehnen, kosmetisch Chirurgie, künstliche Herzen und Herzklappen, Beatmungsbälge, heißsterilisierbare Bluttransfusionsschläuche, Dialyseschläuche, Dichtungen in medizinischen Geräten, Katheter und Schlauchsonden, künstliche Haut, Blasenprothesen
Polyetheretherketon (PEEK)	Matrixwerkstoff für kohlenstoffaserverstärkte Verbundwerkstoffimplantate wie z.B. osteosyntheseplatten und Hüftgelenkschäfte

Polysulfon (PSU)	Matrixwerkstoff für kohlenstoffaserverstärkte Verbundwerkstoffimplantate wie z.B. Osteosyntheseplatten und Hüftgelenkschäfte, Membranen für Dialyse
Polyhydroxyethylmethacrylat (PHEMA)	Kontaktlinsen, Hamblasenkatheter, Naht- materialbeschichtung

Viele Polymere, die heute in klinischem Einsatz stehen, wurden ursprünglich für andere Anwendungen entwickelt. Polymere, die in der Textilindustrie eingesetzt wurden, wie beispielsweise Polyethylenterephthalat (Dacron) werden in der Medizin als künstliche Blutgefäße eingesetzt; künstliche Herzen wurden ursprünglich neben, einer Vielzahl aus verschiedener Kunststoffen, aus "commercial-grade" Polyurethanen hergestellt.

1.6.4 Vorstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kunststoffe

1.6.4.1 Polyvinylchlorid (PVC)

PVC ist der wirtschaftlich bedeutendste Vertreter der Gruppe der Vinylpolymere. Es ist ein vorwiegend amorphes Polymer mit einem Kristallisationsgrad von weniger als 5%. Seine Eigenschaften sind nachfolgend dargestellt:

<u>Eigenschaften</u>	Hart-PVC	Weich-PVC
Dichte[g/cm ³]	1.38-1.40	1.29
Zugfestigkeit [N/mm ²]	50 – 60	10 – 15
Reißdehnung[N/mm ²]	10-50	300-400
Glasübergangstemperatur [°C]	80	-
Gebrauchstemperatur ohne mechanische Beanspruchung in Luft [°C]		
kurzzeitig	75	40 - 50
langzeitig	65	40 - 50
Wasseraufnahme (24h in Wasser, 20°C) [%]	0.2	0.5

PVC kann mittels Masse-, Suspensions- oder Emulsionspolymerisation synthetisiert werden. Hart-PVC zeichnet sich durch relativ hohe mechanische Festigkeit, Steifigkeit und Härte sowie durch eine relativ geringe Kriechneigung aus. Die Flexibilität von PVC wird durch Einsatz von Weichmachern eingestellt wobei der am häufigsten eingesetzte Weichmacher für Weich-PVC Dioctylphthalat (DOP) ist. PVC ist aufgrund seiner hohen chemischen Beständigkeit unempfindlich gegen Spannungsrisskorrosion. PVC-Formteile können über Spritzgießen, Extrudieren, Hohlkörperblasen und Kalandrieren hergestellt werden. PVC-Rohre, -Profile, -Tafeln und -Folien werden in vielfältiger Weise als Halbzeug weiterverarbeitet.

Weich-PVC wird für Blutbeutel, Beutel für parenterale Lösungen (d.h. Zufuhr von Medikamenten oder Nahrungsmitteln durch intrakutane, intramuskuläre oder intravenöse Injektion unter Umgehung des Verdauungstraktes), für Schläuche und Katheter benutzt. Für den medizinischen Einsatz wird hochreines PVC verwendet, welches sehr geringe Mengen an Additiven und Verunreinigungen enthält. Dem für Weich-PVC eingesetzten Weichmacher Dioctylphthalat wird eine potentielle Karzinogenität nachgesagt. Hart-PVC wird als Verpackungsmaterial für Spritzen, Nadeln, Nahtmaterial, Schläuche und Medikamente eingesetzt. Alternativwerkstoffe zu Hart-PVC sind PET und Acryl-Polymere, die bei vergleichbarem Preis eine höhere Transparenz aufweisen. Für Langzeitanwendungen im menschlichen Körper ist PVC aufgrund des je nach Formteil hohen Weichmachergehaltes und seiner Anfälligkeit auf Versprödung nicht geeignet.

1.6.5 Beschichtungen von Fremdoberflächen

1.6.5.1 Beschichtungen von Fremdoberflächen

Mit einer Reihe von Beschichtungsmaterialien und Beschichtungstechniken wird versucht, die Hämö- bzw. Biokompatibilität der Fremdoberflächen zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit wurden die Kunststoffschläuche mit Heparin beschichtet, es kommen jedoch auch andere Methoden zur Anwendung, die hier nicht berücksichtigt wurden. Neben einem Precoating der Schläuche oder Oxygenatoren mit dem Vollblut des Patienten (32) oder PEG-Hirudin-Iloprost, einem Heparin-verwandten Antikoagulanzen (81) wurden auch Silikonbeschichtungen (82) und Prostaglandinbeschichtungen erprobt (39). Die protektiven Eigenschaften des Heparins blieben jedoch unerreicht.

1.6.5.2 Heparinbeschichtung

Das Endothel der nativen Gefäßwand stellt unter anderem als gerinnungshemmende Substanz Heparinsulfat bereit. Dieses Antikoagulanz wird als künstlich hergestelltes Heparin in vielen Bereichen der Medizin verwendet, etwa bei der Beschichtung von Metall- und Kunststoffstents in der Herzkathetertechnik, als auch als lokale Applikation während der Ballondilatation im Rahmen der PTCA. Als Antikoagulanz ist Heparin einer der bestuntersuchten Wirkstoffe.

Larm et al. stellte 1983 eine Beschichtungsmethode für Kunststoffe mit Heparin vor, die sich als wirksame Methode im Langzeiteinsatz und als äußerst stabile Beschichtung erwiesen hat (41). Durch eine spezielle „Befestigung“ des Heparinmoleküls an der artifiziellen Oberfläche bleiben die aktiven Sequenzen des Heparinmoleküls unbeeinflusst. Die Heparinbeschichtung führt nachweislich zu einer Reduktion von

- Kontaktphasenaktivierung
- Komplementaktivierung
- Granulozytenschädigung
- Thrombozytenaktivierung
- Hämostasestörungen
- Blutverlust und
- Neuronalen Schädigungen.

Der Aufbau der Heparinbeschichtungen setzt sich aus wie folgt zusammen:

Blut
Aktiv gebundenes Heparin
Polyalkylenamid
Dextransulfat
Polyalkylenamid
Polymerwerkstoff

Heparin bindet an ein Rezeptorepitop des Antithrombin-III-Komplexes und bewirkt eine Aktivitätssteigerung des AT-III. Diese Eigenschaft scheint jedoch nicht

Hauptgrund einer verbesserten Biokompatibilität zu sein, vielmehr kommt es zu einer verminderten Adhäsion von bestimmten Plasmaproteinen an die Oberfläche während andere Plasmaproteine offenbar selektiv gebunden werden und somit zur Bildung einer „blutfreundlichen“ Oberfläche beitragen. Für die Gerinnungsaktivierung stellen Fibrinogen, Faktor VII, Fibronectin und andere fest an die Oberfläche gebundene Substanzen einen besonders aktiven Faktor dar. Durch Hemmung der Bindung dieser Stoffe an die Fremdoberfläche kann die Gerinnungsaktivierung vermieden oder gemildert werden.

1.6.5.3 Heparin

Heparin ist ein vom menschlichen Organismus synthetisiertes und in Granula der Mastzellen gespeichertes Antikoagulanz. Der Name leitet sich aus dem Hauptbildungsort Leber (lat. Hepar) ab. Es kann ebenso aus Lunge, Ovar, Darm und Gefäßendothel isoliert werden, wobei die physiologische Konzentration im Plasma unter 10ng/dl liegt. Normalerweise ist Heparin im Blut jedoch nicht nachweisbar – statt dessen kann eine Substanz mit sehr ähnlicher Struktur und Funktionalität auf fast allen Oberflächen des Gefäßsystems beobachtet werden, die offensichtlich für einen Teil der natürlichen Antithrombogenität des Endothels verantwortlich ist (Heparinsulfat).

Therapeutisch verwendetes Heparin wird aus Schweinedärmen und Rinderlungen gewonnen und enthält ca. 33% aktive Moleküle. Heparin hat nur im Zusammenwirken mit der im Plasma vorkommenden Antiprotease Antithrombin III (ATIII) einen antikoagulatorischen Effekt. ATIII alleine inaktiviert die Faktoren IIa, Xa, IXa und XIIa langsam. Heparin bildet mit ATIII einen Komplex, wodurch eine Konformationsänderung des aktiven ATIII-Zentrums auftritt und die proteolytische Inaktivierung 1000-fach beschleunigt wird. Sobald sich der ATIII-Heparin-Komplex an den aktiven Faktor gebunden hat, löst sich das Heparin unverändert ab und kann sich erneut an ATIII binden. Heparin inhibiert in sehr viel geringem Ausmaß auch Plasmin, Plasma-Kallikrein und Urokinase. Es ist zu betonen, dass Heparin selbst keine inhibitorische, sondern eine katalytische Funktion ausführt.

Man unterscheidet hoch- (MW 5000-30000 Dalton) und niedermolekulares Heparin (MW 2000-6000 Dalton), welches Faktor Xa ebenso gut inhibiert, jedoch eine geringere Aktivität gegenüber Thrombin ausweist. Es hat dafür den Vorteil einer

längeren Wirkdauer. Durch die sofortige Wirkungsentfaltung nach Einbringen in den Organismus wird Heparin als Sofort- oder Direktantikoagulant bezeichnet.

Das in dieser Arbeit als Antikoagulant eingesetzt Liquemin N25000 der Fa. Hoffmann-LaRoche, Basel, Schweiz, gehört zur Gruppe der unfractionierten Heparine (hochmolekular).

1.6.5.4 Medtronic – Carmeda Bioactive Surface® - Beschichtung

Für die schwedische Firma Carmeda entwickelte Olle Larm (41) in den 80er Jahren eine Methode zur Heparinbeschichtung, die nun von der Fa. Medtronic in Lizenz vertrieben wird. Nach dem schon beschriebenen Prinzip der Endpunktbefestigung der Heparinmoleküle, finden sich aktive Heparinsequenzen auf der blutzugewandten Seite der Beschichtung. Die Carmeda-Beschichtung weist eine Vielzahl von Vorteilen auf :

- Verminderte Neutrophilenaktivierung
- Geringere Expression von CD 11c / CD11b (Adhäsionsepitope)
- Geringere neuronale Komplikationen
- Geringere Drainageblutungen
- Verkürzung des Klinikaufenthalts nach EKZ
- Geringere humorale und zelluläre Aktivierung
- Reduzierung der Komplementaktivierung

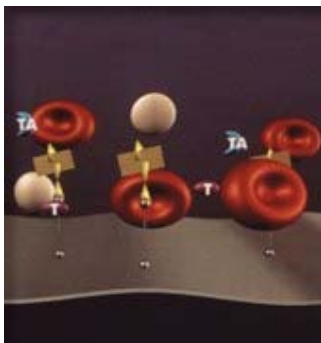


Abb. 1.2 : Carmeda Bioactive Surface mit Endpunktbefestigung des Heparins

Die Wirkung besteht sowohl lokal, als auch lange anhaltend, da das kovalent gebundene Heparin nicht ausgeschieden werden kann. Eigenschaften der Carmeda-Beschichtung :

Lösungsmittel zur Herstellung	Wasserlöslich, keine organischen Lösungsmittel
pH während der Beschichtung	Typ. 3-9
Temperatur bei Beschichtung	Unter 60°C
Bindungsart für Heparin	kovalent
Beschichte Oberfläche	Durch Beschichtung in wässriger Phase innen und außen am Objekt
Dicke der Beschichtung	Typ. 2000A = 200nm
Sterilisierung	Ethylenoxid
Verwendungsdauer	2-5 Jahre Lagerung möglich
Hydrophilität	Hydrophil

Abb. 1.3 : Eigenschaften der Carmedabeschichtung

Die Carmeda-Beschichtung ist ausreichend widerstandsfähig gegen höhere Scherkräfte in turbulenten Strömungen.

1.7.0 Antikörper zur Detektion von Aktivierungsmarkern

1.7.1 Verwendete Arten von Antikörpern

Antikörper binden mehr oder weniger spezifisch an Rezeptoren bzw. Epitope einer Zielstruktur. Dieses Ziel kann sich auf der Oberfläche einer Zelle befinden oder im Inneren der Zelle liegen. Antikörper werden nach der CD-Klassifikation eingeteilt. Verwendete Oberflächenantikörper in dieser Arbeit sind CD11B, CD11C, CD18 und CD 62L auf Leukozyten, Antikörper gegen Fibrin und Fibrinogen, sowie CD41 auf Thrombozyten. Weiterhin wurden intrazelluläre Antikörper verwendet für die Markierung der intrazellulären Enzyme Oxidativer Burst, Elastasen (RGES, AAPV), Kallikrein und Peroxidase. Ebenfalls intrazellulär wurden die Interleukine markiert. Während die Oberflächenepitope technisch einfach mit Antikörpern zu markieren sind, müssen für die intrazellulären Epitope Zugangswege durch die Membran der

Zelle mit Hilfe von Permeabilisatoren geschaffen werden (siehe Kapitel CellProbe). Hierbei darf die Integrität der Zelle nicht zu stark beeinträchtigt werden.

In der Mehrzahl handelt es sich um monoklonale Antikörper, lediglich in einem Versuch (Fibrinogen) wurde ein polyklonaler Antikörper getestet. Die genauen Eigenschaften der für die Arbeit ausgewählten Epitope und der dafür ausgewählten Antikörper werden im Kapitel Material und Methoden vorgestellt.

1.8.0 Markierung der Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen

Für die Detektion der gebundenen Antikörper mit der Durchflußzytometrie werden diese mit Fluorochromen konjugiert. Prinzipiell können diese Antikörper-Fluorochrom-Konjugate kommerziell als Fertigprodukt erworben werden oder der nicht-konjugierte Antikörper in einem zweiten Versuchsschritt mit einem fluoreszierenden „Anti-Antikörper“ nachmarkiert werden. Ersterer Möglichkeit wird der Vorzug gegeben, da bei jeder Markierung eines Epitops mit einem Antikörper Wasch- und Fixierungsschritte erforderlich sind, die unweigerlich zu einem Zellverlust im Substrat führen. Da für die Durchflußzytometrie eine Lyse der Erythrozyten im Substrat mit mehrfachem Waschen der Suspension mit einem weiteren Zellverlust obligatorisch ist, bleibt die Sekundärmarkierung die Ausnahme (Sekundärmarkierung der Fibrin- und Fibrinogenantikörper).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluorochrome FITC, PE und PECy5 eingesetzt.

Fluorochrom / Farbstoff	Anregung (nm)	Emission (nm)	MW	Bemerkung
R-Phycoerythrin (PE)	480;565	578 (rot-orange)	240	
PE-Cy5 conjugates	480;565;650	670 (rot)		aka Cychrome, Tri-Color, Quantum Red
Fluorescein (FITC)	495	519 (grün)	389	FITC; pH sensitiv
Texas Red	589	615 (rot)	625	Sulfonyl chloride

Cy5	625-650	670		
Propidium Iodide (PI)	536	617	668	

Abb. 1.4 : Übersicht Fluorochrome

Fluorochrome absorbieren (Exzitation) Licht einer bestimmten Wellenlänge wandeln gewissermassen die Energie und emittieren Licht einer anderen Länge (Emission). Die genaue Kenntnis der Fluorochromeigenschaften der kommerziellen Antikörper sind für die Geräteeinstellung unabdingbar, da bereits kleine Abweichungen der Wellenlängen die vom Fluorochrom ausgestrahlte Lichtenergie ohne Gerätenachjustierung nicht detektierbar machen. Besonders Stellung haben die Tandemkonjugate wie PE-Cy5, einem Komplex aus zwei Farbstoffen (Fluorochromen) mit dem Nachteil einer Verminderung der Gesamtemission und einer schlechteren Detektion der zwei emittierten Wellenlängen, da das PE für eine optimale Emission die gesamte Energie auf das Cy5-Fluorochrom übertragen müsste, was in der Praxis nicht der Fall ist. Folge ist eine PE-Abstrahlung, die schwer zu kompensieren ist und bei schwachen Signalen die Detektion unmöglich machen kann.

1.9.0 Durchflußzytometrie

1.9.1 Einführung

Die Durchflußzytometrie erfasst Eigenschaften von Partikel oder Zellen, während diese den Strahl eines Lasers durchwandern und ihn dabei unterbrechen bzw. das Licht streuen. Hierbei erzeugte Signale lassen Rückschlüsse auf verschiedene Eigenschaften der gemessenen Objekte zu. Diese multiparametrische Analyse lässt sich prinzipiell an allen biologischen Zellen durchführen. Grundvoraussetzung ist das Vorliegen einer Probe als Einzel- oder Gemischtsuspension in einer Konzentration von etwa einer Million Partikel (Zellen) pro Milliliter. Zellen aus Gewebeverbänden müssen hierzu erst mechanisch bzw. enzymatisch aus dem Verband isoliert werden.

Die Verarbeitung der Probe im Gerät beginnt mit der Auflagerung der Suspension, bzw. der zu messenden Partikel, durch Druck oder Ansaugung auf eine

Trägerflüssigkeit (Sheath Fluid), die von einer Seite in die Durchflußkammer (Flow-Chamber) eingebracht wird und die Kammer durchfließt.

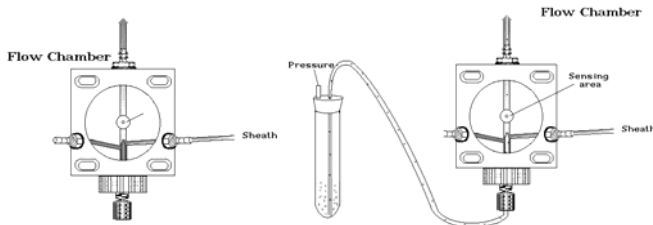


Abb 1.5 : Prinzipieller Aufbau einer Durchflußkammer

Da die Fließgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit gegenüber der Suspension schneller ist werden die Partikel in eine Reihe auf den Strom gelagert. Wird die Sheath-Fließgeschwindigkeit (Flow Rate) herabgesetzt, befinden sich mehr Zellen im Strom durch die Kammer durch deren Mitte der Laserstrahl hindurchtritt. Dagegen vermindert sich die Partikelrate pro Zeiteinheit, wenn die Fließgeschwindigkeit heraufgesetzt wird. Dieser Prozess wird als Hydrodynamic Focusing bezeichnet. Das Hydrodynamic Focusing kann somit als Instrument zur Einstellung von mehr und weniger dichten Flüssigkeiten dienen und gewährleistet, dass auch die Partikel in sehr dichten Suspensionen noch als einzelnes Element vermessen werden können.

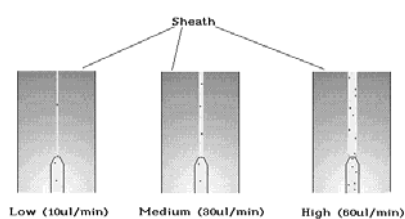


Abb. 1.6 : Hydrodynamic Focusing mit Hilfe variabler Sheath-Fließgeschwindigkeiten

In der Kammer passieren die Partikel den elliptisch aufgeweiteten Laserstrahl. Bei diesem Durchtritt wird auf die Partikel fallendes Licht in verschiedene Richtungen gestreut. Hierbei wird das von der Oberfläche des Partikels gebeugte/abgelenkte Laserlicht als Vorwärtstreulicht bezeichnet und trifft auf den Vorwärtstreulicht-

Sensor, der das einfallende Licht in einen der Größe des Partikels proportionalen elektrischen Impuls umsetzt.

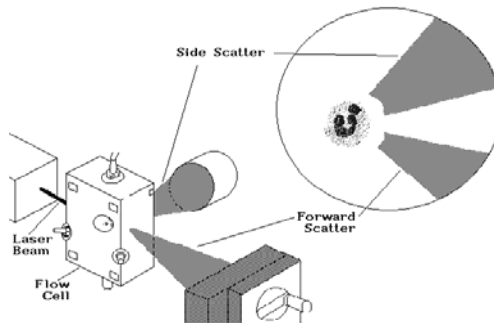


Abb. 1.7 : Detektion des Vorwärtsstreulichtes

Kleine Partikel erzeugen dementsprechend kleinere Impulse als größere. Unterscheidbar sind Partikel mit einem Durchmesser von weniger als $0,5 \mu\text{m}$. Für Partikel, die größer als $20 \mu\text{m}$ sind, besteht die Möglichkeit einen Neutral Density Filter in den Strahlengang einzubringen, um das Streulicht und somit auch den resultierenden Impuls abzdämpfen. Neben der Größe wird auch die Granularität der Oberfläche des Partikels über den Detektor für Seitwärtsstreulicht erfasst. Laserlicht, das von Strukturen im Partikel selbst oder durch Granula auf der Oberfläche abgelenkt/gebeugt wird, macht den größten Teil des Seitwärtsstreulichts aus. Farbstoffe (Fluorochrome), die im Partikel oder auf seiner Oberfläche gebunden sind, entziehen dem Laserlicht Energie (Exzitation) und emittieren durch verschiedene Wellenlängen charakteristische Farben. Diese Fluoreszenzfarben werden im Strahlengang des Seitwärtsstreulichts jeweils durch spezielle Filter aus dem Strahlengang des Seitwärtsstreulichtes ausgelenkt und von zugeordneten Detektoren/Sensoren ausgewertet.

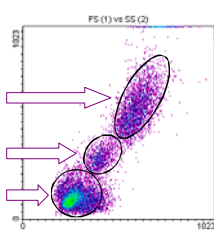


Abb. 1.8: Prinzipielle Darstellung eines Diagramms mit den Achsen Forward-Scatter und Sideward-Scatter, dargestellt sind die 3 Leukozytenpopulationen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten)

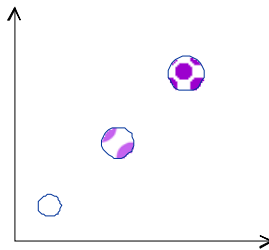


Abb. 1.9: X-Achse – Sideward-Scatter (Seitwärtsstreulicht = Refraktionsindex, entspricht der Granularität (bzw. Membranfältelung, äusser Beschaffenheit). Y-Achse – Forward-Scatter (Vorwärtsstreulicht) entspricht der Zellgröße (Querschnittsfläche)

Diese werden als Photomultiplier Tubes (PMT) bezeichnet, wobei Durchflußzytometer in der Regel neben den Detektoren für Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht mit zwei bis vier verschiedenen Detektoren für farbiges Licht verschiedener Wellenlängen ausgestattet sind. Hierdurch kann die gleichzeitige Messung von Zellen erfolgen, auf denen mit mehreren Farbstoffen Epitope markiert wurden. Die PMT's wandeln das einfallende Licht in einen Stromimpuls um, der entsprechend der zugeführten Lichtmenge größer oder kleiner ist.

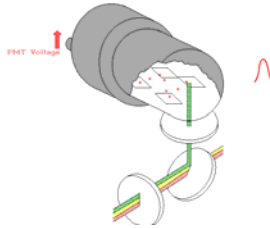


Abb. 1.10 : Auslenkung der Wellenlänge einer definierten, vom Partikel emittierten, Fluoreszenz durch Filter und Umlenkung in die zugeordnete Auswertungseinheit

Durch eine gezielte Auslenkung verschiedener Farben aus dem Lichtstrahl über ein Filtersystem ist die Messung verschiedenster Farbstoffe möglich.

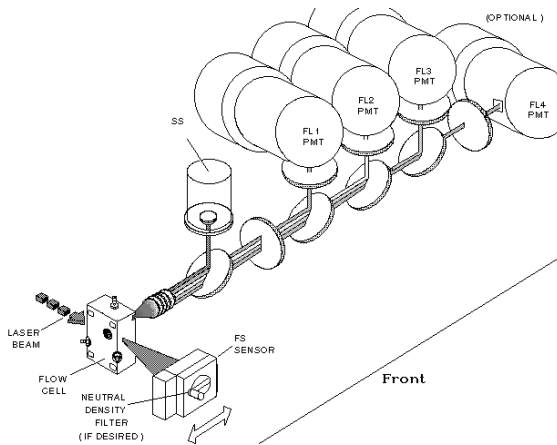


Abb. 1.10: Optische Bank des Durchflußzytometers mit mehreren PMT's für unterschiedliche Wellenlängen

Der Farbstoff FITC fluoresziert beispielsweise hauptsächlich im grünen Bereich und kann daher vom PMT für Grün (525nm) detektiert werden. Da Farbstoffe oft nicht in einem engen Bereich des Farbspektrums fluoreszieren sondern etwas weiter im Farbspektrum streuen, können sie unter Umständen in den PMT's für „benachbarte“ Farben (rot-orange / orange-gelb) detektiert werden – die Wellenlängen überlappen.

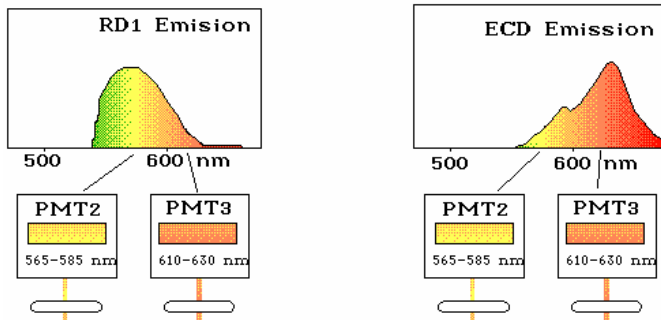


Abb. 1.11: Bei Farben, die das Spektrum der einzelnen PMT's überschneiden ist eine Berechnung der Impulswerte, sowie eine Korrektur notwendig

In diesem Fall wird der PMT mit dem stärksten Signal, entsprechend der größten Lichtmenge, zur Analyse ausgewählt. Beim Einsatz mehrerer Farbstoffe benachbarter Spektren in der gleichen Probe müssen diese Überlappungen elektronisch kompensiert werden, da sie gegenseitig interferieren. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Dye-to-Dye-Interferenzen kompensiert werden müssen und dass eine Fluoreszenz unter Umständen von mehreren PMT detektiert werden kann.

1.9.2 Exzitation, Emission und Filter im Zusammenspiel

Licht besteht aus partikelähnlichen Paketen (Photonen), wobei jedes Photon eine bestimmte Farbe (Wellenlänge) des Lichtes repräsentiert. Lichtquellen wie z.B. Laserlicht emittieren nur eine einzige Photonart, während andere Lichtquellen eine Vielzahl Photonen/Wellenlängen aussenden. Das menschliche Auge ist nicht in der Lage unterschiedliche Lichtfarben zu trennen, es nimmt den Querschnitt wahr, wobei die Intensität resp. der Helligkeit des Lichts auf der Anzahl der präsenten Photonen beruht. Photonen scheinen auf ihrem Weg zu schwingen, was auf die Energien im inneren des Photons zurückzuführen ist und je höher diese Schwingungen sind, desto stärker ist die Energie des Photons. Photonen bewegen sich mit Lichtgeschwindigkeit und die Strecke, die ein Photon während einer Schwingung / Frequenz zurücklegt, definiert seine Wellenlänge, die in Nanometer angegeben wird. Je höher die Energie eines Photons, desto geringer ist seine Wellenlänge.

Fluoreszierende Farbstoffe absorbieren Photonen (Lichtenergie), wobei bestimmte Farben oder Wellenlängen stärker absorbiert werden. Die Darstellung der absorbierten Energie gegenüber den angebotenen Wellenlängen kann eine Exzitationskurve darstellen. Farbstoffe wie FITC, AO, PI, und PE werden bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt, was der Wellenlänge eines Argonlasers entspricht. Gleichzeitig wird die absorbierte Energie vom Farbstoff wieder als Fluoreszenz abgegeben. Die Darstellung der relativen Intensität gegenüber der Wellenlänge entspricht hierbei der Emissionskurve. Gut darstellbare Farbstoffe absorbieren Energie einer niederen Wellenlänge und emittieren viel weiter rechts auf der Farbskala, dieser Unterschied zwischen dem Maximalpunkt der Exzitationskurve und dem der Emissionskurve wird als Stokes´scher Shift bezeichnet.

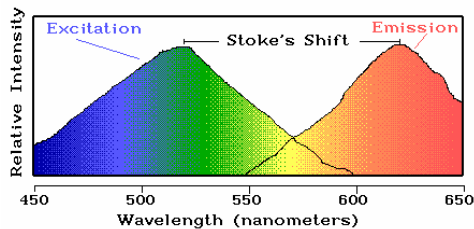


Abb. 1.12: Stokes´scher Shift: Abstand zwischen der Wellenlänge des Lichtes das für die Anregung des Farbstoffes benötigt wurde und der Wellenlänge des emittierten Lichtes

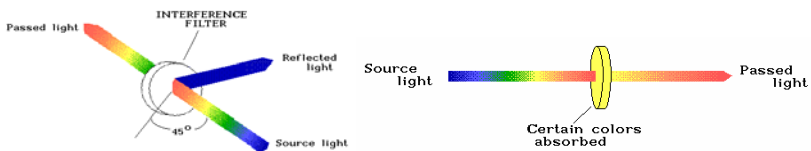


Abb.1.13 : Einsatz von Filtern zur Auslenkung von bestimmten Wellenlängen

1.9.3 Kompensierung der Fluoreszenz

Beim Einsatz eines einzigen Farbstoffes in einer Messung /Probe repräsentiert das in den PMT eindringende Licht die Menge eines einzelnen Farbstoffes der an den Partikel / Zelle gebunden hat. Werden jedoch zwei oder mehr Farbstoffe an die Zelle

gebunden (z.B. FITC und PE) interferieren die Fluoreszenzen. Die Stärke der Interferenz ist abhängig von der Überlappung der einzelnen Fluorochrome im Emissionsspektrum und der relativen Intensität der Fluoreszenzen. In diesem Fall wäre es denkbar Filter einzusetzen, jedoch würden diese Filter auch das Fluoreszenzsignal der zu messenden Farbe abschwächen. Die Lösung basiert auf der Annahme, dass das interferierende Licht einen gewissen Prozentsatz des Lichtes des vom interferierenden ausgehenden Farbstoffs ausmacht. Die PMT-Impulse repräsentieren entweder das Licht des Farbstoffes oder das Licht des interferierenden Farbstoffes. Indem ein Prozentsatz des Impulses des interferierenden Lichtes abgezogen wird, wird ein Impuls erzeugt, der nun dem Farbstoff alleine entspricht. Dabei bleibt der Prozentsatz bei jedem Einzelevent gleich, orientiert sich aber im Endeffekt an der totalen Lichtmenge, die der interferierende Farbstoff bei dieser Einzelmenge ergibt. Dieser Prozentsatz wird in der Regel nur einmal bestimmt und dann für alle Messungen mit den gleichen Farbstoffkombinationen beibehalten.

1.9.4 Datenauswertung und Gating

Bei den Signalen, die das Durchflußzytometer aus den Detektoren ermittelt, besteht die Möglichkeit zwischen zwei erzeugbaren Impulsarten zu wählen – Peak- und Integral-Impuls. Der Peak-Impuls wird direkt aus den PMT's übernommen und erfährt keine Veränderung. Er erreicht seinen höchsten Wert, wenn der Partikel sich direkt im Laserlicht befindet und somit eine Aussage über den maximalen Helligkeitswert des Partikels. Ein integraler Impuls hingegen erreicht sein Maximum, wenn der Partikel der Laserstrahl gerade wieder verlässt und informiert über die gesamte Menge des Lichts, das auf den Sensor trifft.

Das System ist demnach im Besitz von zwei Informationen über den Partikel : die maximale Lichtmenge (Peak) und die gesamt Lichtmenge (Integral) . Die Peak und Integral-Impulse sind in der Regel zu schwach und müssen verstärkt werden. Hierfür kann entweder direkt eine Vorspannung an die PMT angelegt oder einen Verstärkungsfaktor (Gain) gesetzt werden, wobei alle Impulse erst nach der Einzelzellmessung durch die PMT's mit einem Verstärkungsfaktor (z.B. um den Faktor 5) multipliziert werden. Die Verstärkungen verursachen eine einige störende Impulse, deren Ursache meist die unwillkürliche Verstärkung von Zellrümmern

(Debris) ist. Diese unerwünschten Impulse werden durch Einsatz eines Schwellenwertes von der weiteren Signalverarbeitung ausgeschlossen (Rauschunterdrückung (Noise Reduktion), Hintergrundrauschen). Impulse, die den Schwellenwert übersteigen werden jetzt in Zahlen konvertiert (Analog-Digitale Umwandlung, Analog Digital Conversion = ADC), die im folgenden als Kanäle bezeichnet (z.B. 1-1024). Die Impulse werden ihrer Größe entsprechend (5V entspricht z.B. Kanal 500, bei 100 Impulsen mit je 5V entfällt auf den Kanal 500 der Wert 100) auf die Kanäle getrennt und gezählt. Die gewählte Anzahl der Kanäle spiegelt das Auflösungsvermögen der Messung wieder (128, 256, 1024 Kanäle).

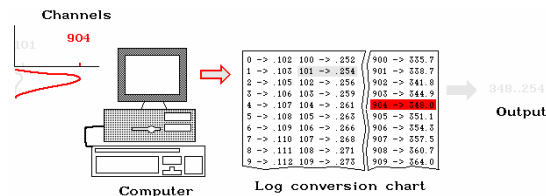
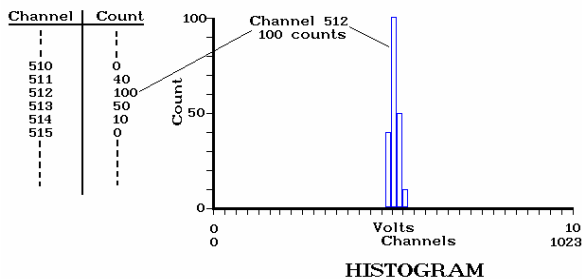


Abb. 1.14 : Übertragung der Messwerte in Kanäle und in eine Zahlenkolonne

Es entsteht ein Histogramm auf dessen X-Achse die Kanäle und auf der Y-Achse sich die Anzahl der Ereignisse (Events) in den entsprechenden Kanälen ablesen lassen (Single-Parameter-Histogramm). Bei einer großen Streuweite der Impulswerte ist es sinnvoll als Kanal-Achse eine logarithmische Skala zu verwenden. Die Darstellung der Impulse eines Messwertes (z.B. Vorwärtsstreulicht = Größe) gegenüber Impulsen eines anderen Messwertes (z.B. Granularität) wird Zweiparameter-Histogramm genannt (Topografische Anzeige / Dot-Plot / Density Plot) .

Dem Bediener wird nun ermöglicht, in Zwei-Parameter-Histogrammen interessierende Partikelwolken oder Histogrammabschnitte (Zellpopulationen) durch Setzen einer zweidimensionalen Begrenzung (Gate) zu isolieren und Daten ausschließlich über diese Population zu sammeln. Dieses Gating um eine interessierende Population erfolgt in zwei Schritten: Das Gate wird als amorphe, quadratische oder elliptische Begrenzung um die gewünschte Region gesetzt. Im folgenden Schritt wird das Gate einem neuen Histogramm zugeordnet, so dass nur Daten aus diesem Gate im zugeordneten Histogramm angezeigt werden.

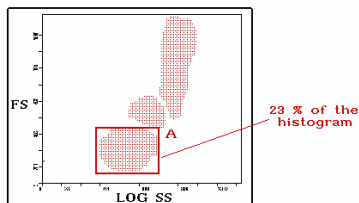


Abb. 1.15 : Das Gating einer Population ermöglicht weitere Auswertungen in einem Ausschnitt der Zellpopulation

Schließlich werden die dem Gate zugeordneten Histogramme statistisch ausgewertet. Hierfür werden wiederum Regionen in die 1-Parameter-Histogramme eingebracht, die einen ausgewählten Teil der Kurve im Histogramm in verschiedener Hinsicht statistisch auswerten (maximaler Wert, prozentualer Anteil der Ereignisse in der Region gegenüber der gesamten Kurve des Histogramm etc.).

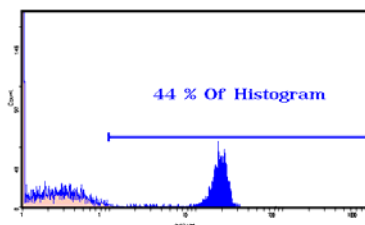


Abb. 1.16 : Zwei-Parameter-Histogramm eines Merkmals einer zuvor im Gate erfassten Population

Praktisch bedeutet dies, dass mit dem ersten Gate eine Zellpopulation erfasst und diese für sich in einem dafür erzeugten Histogramm auf ein weiteres Merkmal (Fluoreszenz) untersucht wird. Bei der Analyse eines 2-Parameter-Histogramms werden die statistischen Ergebnisse jeweils für die X- und die Y-Achse getrennt ausgegeben. Die heutige Software der Durchflußzytometer ermöglicht ein weites Spektrum möglicher Verknüpfungen und Berechnungen zwischen verschiedenen Regionen nach analytischen Gesichtspunkten.

1.9.5 Auswertung der Ergebnisse

Meist werden durchflußzytometrische Daten anhand der erzeugten Histogramme ausgewertet bei denen die X-Achse die relative Fluoreszenzaktivität und die Y-Achse die Anzahl der Ereignisse darstellt. Von Vorteil ist hier die Simplizität der Darstellung, nachteilig ist, dass nur ein Parameter sichtbar ist. Die Überlagerung verschiedener Parameter in einem Histogramm mit Hilfe von Freeware-Fremdprogrammen (FACSOvl®) erscheint eher unübersichtlich. Für eine präzise Auswertung ist auf eine ausreichende Zellzahl pro Messung zu achten, die in dieser Arbeit meist bei 20.000-50.000 Zellen lag (Stop value). Weitere wichtige Histogramme sind die Hintergrundfluoreszenz (Background-Fluorescence / Autofluoreszenz), die eine Messung der nicht-fluoreszenzmarkierten Probe mit deren Eigenfluoreszenz darstellt, sowie das Fluoreszenzsignal der Isotypkontrolle (Negative Staining), einer Markierung der Zellen mit ebenfalls fluoreszenzmarkierten Immunglobulinen der entsprechenden Immunglobulinklasse des später verwendeten Antikörpers (Test auf unspezifische Bindungen). Diese Histogramme werden vor den eigentlichen Messungen erstellt und die nachfolgende Messung gegebenenfalls durch Korrektur der Geräteeinstellungen optimiert. Autofluoreszenz und Negative Staining werden obligatorisch für jeden Versuch mitgeführt. Nachdem die zu untersuchende Zellregion (i.S. eines steilen, schmalen Anstiegs der Fluoreszenzkurve) optimal erfasst wurde, erfolgt die automatische Berechnung der statistischen Werte. Hauptaugenmerk liegt hierbei auf der Mean Fluorescence Intensity (MFI). Ein weiterer Parameter ist der Median der Fluoreszenz.

1.9.6 Datenverarbeitung / Qualitätssicherung der Daten

Die Datenverwaltung der Messdaten ist bei den meisten Durchflußzytometern standardisiert. Rohdaten werden in Listmode-Dateien gespeichert und nach der Messung nicht mehr verändert. Eine Analyse bedient sich immer der Rohdaten und liest diese in ein Analyseprotokoll ein. Dies hat den Vorteil, dass Daten wieder nach neuen Gesichtspunkten untersucht werden können ohne die realen Messwerte zu ändern. Die Datenspeicherung erfolgt auf magnetischen oder optischen Medien. Zusätzlich wird von jedem Mess- und Analysevorgang ein Protokoll ausgedruckt.

Wie bereits erwähnt können die Messdaten des Coulter Epics XL entweder mit der Originalsoftware oder mit frei verfügbaren Programmen ausgewertet werden. In dieser Arbeit wurde die Epics XL-Software, sowie das Programm WinMDI 2.8 und FACS-OVL 2.0 verwendet.

1.9.7 Besonderheiten des Coulter EPICS XL System II

Das verwendete Coulter Epics XL MCL- Durchflußzytometer verfügt über ein Karussell in der Probenzuführung für 50 FACS-(Falcon)-Probenröhrchen. Um eine optimale Beschriftung und Probenidentifizierung zu erreichen wurde das integrierte Barcodelesesystem genutzt und mit CorelDraw® Barcodes im Code128-Format erzeugt.

1.10.0 Simulationsmodell für die extrakorporale Zirkulation

Als Simulationsmodell für die extrakorporale Zirkulation kommt in dieser Arbeit der Chandler-Loop zum Einsatz. Mit Blut gefüllte Ringe (Loops) aus verschiedenen Schlauchmaterialien und Beschichtungen rotieren im Wasserbad. Die „Blutsäule“ steht quasi, der Kunststoff rotiert um die Blutsäule und simuliert einen Fluss. Zu definierten Zeiten werden die Loops entnommen und daraus Proben zur Analyse abgenommen. Die genau Funktionsweise des Chandler-Loops ist im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben.

1.11.0 Hinführung zum Thema

Der Aufbau des menschlichen Körpers ist komplex strukturiert, dass die vollständige funktionelle Substitution seiner Strukturen mit künstlichen Werkstoffen und Bauteilen nahezu unwahrscheinlich ist.

In der modernen Medizin besteht jedoch die Notwendigkeit, temporär oder langfristig, verschiedene Körperfunktionen zu ersetzen oder zu simulieren. Dieser Ersatz kann physiologische und mechanische Funktionen übernehmen und sowohl im Körper, als auch außerhalb zum Einsatz kommen. Das Spektrum der Anwendungen dabei breit gestreut (Kathetersysteme, Schläuche, Herzschrittmacher, Herzklappen etc.).

Grund für die Übernahme der Funktionen durch Geräte oder Implantate stellt meist der Ausfall körpereigenen Gewebes durch singuläre Defekte oder als Ergebnis chronischer Erkrankungen dar.

Auf dem Gebiet der Herzchirurgie ersetzen Kunststoffschläuche während einer Herztransplantation oder der Bypasschirurgie unter Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine überbrückend die Blutgefäße des Patienten. Die physiologischen Kernfunktionen des Kreislaufs und des Gasaustauschs werden durch den Einsatz von Oxygenatoren und Pumpen aufrechterhalten. Während der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) besteht eine große Kontaktfläche zwischen dem Organ Blut und den künstlichen, unphysiologischen Oberflächen der unterstützenden Geräte in der Größenordnung von etwa 3 Quadratmetern.

Jeder Kontakt menschlicher Strukturen mit Fremdmaterialien und –Oberflächen führt unweigerlich zu Abwehrreaktionen auf breiter oder auch sehr spezifischer Basis. Die Werkstoffe der Fremdoberfläche sollten daher weitestgehend biokompatibel sein, um diese Abwehrreaktion zu minimieren. In Bezug auf die vorliegende Arbeit sind die Kriterien Hämokompatibilität und Zytokompatibilität von Relevanz.

Ziel der Materialforschung ist, die optimale Verträglichkeit zwischen einem biologischen und einem technischen System herzustellen, wobei sich das eingebrachte Material dem Körper gegenüber weitgehend neutral verhalten, zu keinen Abbaureaktionen führen und auch auf den Stoffwechsel keine bedeutenden Einflüsse haben sollte. Dieses Ziel kann sich durch Struktur- und Oberflächenoptimierung der Werkstoffe genähert werden. Insbesondere die Auswirkungen durch eine Beschichtung der Oberfläche mit Pharamaka (Heparin) werden von vielen Studiengruppen untersucht.

Die rasante Entwicklung von biokompatiblen Werkstoffen für die klinische Anwendung spiegelt auch die zunehmende Anzahl von Patienten wieder, die auf den teilweisen oder totalen Ersatz einer oder mehrerer Körperfunktionen, z.B. bei einer Transplantation von Organen, angewiesen sind. Bei einer steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung wird auch der Bedarf an Implantaten und Prothesen stark zunehmen. Dies trifft insbesondere auf das Gebiet der Herzchirurgie vor dem Hintergrund zunehmender arteriosklerotischer Veränderungen mit der Notwendigkeit von chirurgischer Interventionen zu.

1.11.1 Gegenstand der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluation von neuen Testmethoden zu Bewertung der Hämokompatibilität zweier Fremdoberflächen. Stellvertretend für die Vielzahl von Fremdoberflächen und weiteren Beschichtungsverfahren wurden unbeschichtetes Polyvinylchlorid (PVC) und ein mit einer Beschichtung aus Heparin versehenes PVC (Carmeda Bioactive Surface) ausgewählt. Mit Hilfe eines Modells wurde die Simulation einer extrakorporalen Zirkulation durchgeführt. Verschiedene laborchemische Analysen testeten nach der Simulation den Einfluß der Fremdoberfläche auf die Blutzellen um Aussagen über die Hämokompatibilität der beiden Fremdoberflächen treffen zu können. Als Analysemethoden kommen zwei grundsätzlich unterschiedliche Verfahren zum Einsatz.

1.11.2 Laborchemische Analysemethoden

Um die Hämokompatibilität der Fremdoberflächen untersuchen und vergleichen zu können wurden Laboruntersuchungen des Bluts durchgeführt, das mit der Oberfläche in zirkulatorischem Kontakt stand. Hierbei kamen sowohl konventionelle enzym-immunologische Bestimmungsmethoden (humorale Marker), als auch Untersuchungen mit Hilfe der Durchflußzytometrie zur Anwendung. Bei der Durchflußzytometrie handelt es sich um eine direkte Messung von fluoreszierenden Antikörpern gegen Antigenstrukturen auf der Zelloberfläche oder im Inneren der Zelle.

1.11.3 Welche Fragen sollte diese Arbeit beantworten ?

- 1) Gibt es neue laborchemische Ansätze, um die Hämokompatibilität von Fremdoberflächen zu testen ?
- 2) Sind diese Methoden hinreichend aussagekräftig in Hinsicht auf ihre Durchführbarkeit im Labor, ihre Störanfälligkeit und ihre Reproduzierbarkeit im Rahmen von kleineren und grösseren Versuchsreihen ?
- 3) Welche methodischen und praktischen Erfahrungen mit den Messungen werden gemacht ?

- 4) Wie lassen sich die experimentellen Methoden optimieren ?
- 5) Gibt es besondere Schwierigkeiten, die einen Nachteil für die eine oder andere Methode bedeuten oder die technische Durchführung verbieten ?
- 6) Haben heparinbeschichtete Kunststoffoberflächen bessere hämokompatible Eigenschaften als unbeschichtete Kunststoffe und mit welchen Untersuchungen lässt sich dies nachweisen ?
- 7) Ergeben sich Vorteile durch die Anwendung durchflußzytometrischer Untersuchungsmethoden oder sind die konventionelle Messmethoden ebenso geeignet ?
- 8) Sind durch die intrazelluläre Detektion von Antigenen neue oder bestätigende Aussagen über Biokompatibilitätsunterschiede möglich ?
- 9) Können neue Erkenntnisse über den Pathway der Aktivierungskaskaden im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation gewonnen werden ?

2.0.0 Material und Methoden

2.1.0 Übersicht des Versuchsablaufs

Für die Bestimmungen der Marker wurde den Probanden Blut entnommen und in den Ringen des ChandlerLoop-Simulationsmodells aktiviert. Die Entnahme des Bluts auf den Ringen erfolgte zu definierten Zeitpunkten um eine eventuell vorhandene Kinetik erfassen zu können. Die Proben wurden nach der Entnahme jeweils den durchflußzytometrischen Bestimmungsmethoden oder den konventionellen, enzymatischen Methoden zugeführt.

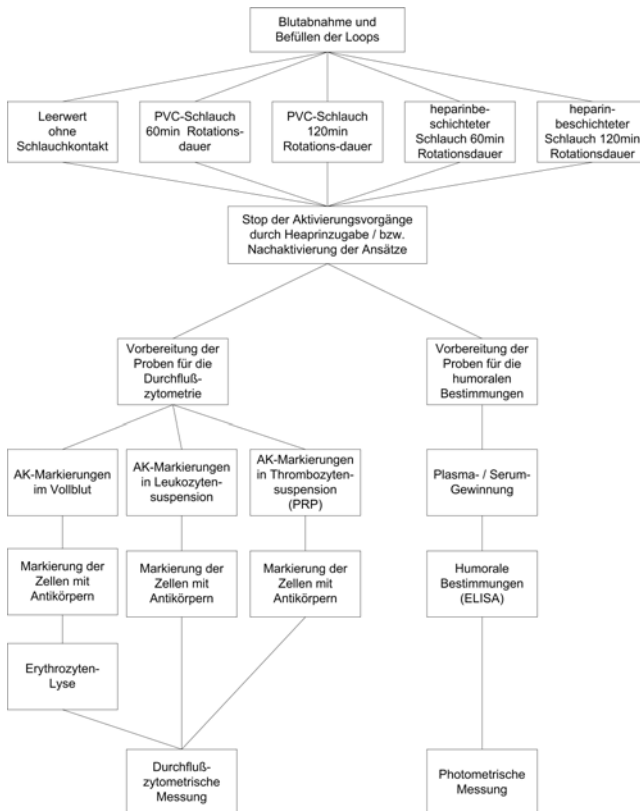


Abb. 2.1 Übersicht des Versuchsablaufs

2.2.0 Probandenauswahl

Die Durchführung der Versuche erfolgte mit frisch gewonnenem venösem Blut eines gemischten Pools gesunder Probanden. Die geschlechtliche Verteilung betrug etwa 1:1. Folgende Ausschlusskriterien wurden festgelegt:

- Einnahme von Acetylsalicylsäure oder anderen gerinnungshemmenden Medikamenten in der Zeit von bis zu 14 Tagen vor der Blutspende
- Nikotingenuss
- Einnahme von Kontrazeptiva
- bestehende oder vermutete Schwangerschaft.

Die sitzenden Blutspender wurden mit einem 19-G-Butterfly Venenpunktionsbesteck der Firma Abbott® punktiert. Auf eine Stauung vor der Abnahme wurde weitgehend verzichtet oder diese bis maximal 40mmHg durchgeführt. Bei Vermeidung eines zu starken Sogs während der Abnahme sollte die Transmissionszeit der Zellen zwischen Gefäßlumen und Stabilisatormedium in der Monovette sollte unter einer Sekunde liegen. Ziel war es, dass es durch den Vorgang der Blutabnahme selbst nicht zu einer artifiziellen Aktivierung kam.

2.3.0 Blutabnahmesystem

Das von Probanden gewonnene Blut wurde in 9ml Monovetten abgenommen. Die für die Befüllung der Schläuche vorgesehenen neutralen Monovetten enthielten als Antikoagulant 1 IU Heparin (Liquemin®) pro Milliliter (9 IU Heparin / 9ml-Monovette). Diese Monovetten wurden unmittelbar nach der Abnahme vorsichtig zweimal geschwenkt um eine Durchmischung mit dem Antikoagulant zu erreichen und in einem PVC-Gefäß zusammengeführt („Pooling“). Für die Leer- und Kontrollwerte wurden Monovetten mit 10 IU Heparin pro Milliliter eingesetzt (90 IU / Heparin / 9ml-Monovette) sowie je nach Bestimmung jeweils eine vorkonfigurierte 9ml/4, 5ml-Monovette mit EDTA, Citrat oder Granulat zur Serum/Plasmagewinnung abgenommen. Für Thrombozyten-Analysen kam eine speziell hergestellte Thrombozytenstabilisierungslösung in nachfolgender Kombination mit Thrombozytenfixierungslösung zum Einsatz (siehe Methoden). Ziel dieses Abnahmesystems ist es, die Kontrollwerte möglichst im „Status quo“ des

Entnahmezeitpunktes zu erhalten, bzw. diese als Momentaufnahme unter Ausschluss weiterer Veränderungen zu konservieren. Die Proben für die Leer-/Kontrollwerte wurden sofort nach der Entnahme verarbeitet oder, falls erforderlich, entsprechend den im jeweiligen Methodenabschnitt angegebenen Richtlinien bis zum Ende des Chandler-Loop-Durchlaufs gelagert. Jeder Proband spendete pro Schlauch 20ml Blut, sowie ca. 25ml Blut für die Leer-/Kontrollwerte. Im Schnitt wurden etwa 120 ml Blut pro Versuch benötigt.

2.4.0 Chandler-Loop als Simulationsmodell für die extrakorporale Zirkulation

2.4.1 Aufbau und Anwendung als Simulationsmodell für die HLM

2.4.1.1 Chandler Loop I (ursprünglich)

1958 veröffentlichte A.B.Chandler in seiner Veröffentlichung „In-vitro- Thrombotic Coagulation of the Blood“ eine Methode, um einen Thrombus in einer bewegten Blutsäule in vitro entstehen zu lassen (11) . Zu diesem Zeitpunkt gab es nur wenige Möglichkeiten für Thrombosestudien unter kontrollierten Laborbedingungen in vitro.

In der vorgestellten Methode floss Blut in einem kreisförmig geschlossenen Schlauch, welcher auf einer geneigten, elektrisch angetriebenen Drehscheibe rotierte. Der aus Polyvinyl bestehende Schlauch hatte eine Länge von 25 cm und einen Innendurchmesser von 0,375 cm. Durch Füllung des Schlauches mit 1ml Blut entstand eine Blutsäule von 9,9 cm Höhe darin. Nachdem der „Loop“ auf der Drehscheibe zentriert worden war, ließ Chandler ihm mit 17 Umdrehungen pro Minute und einer Neigung der Drehscheibe von 23 Grad rotieren. Diese Drehgeschwindigkeit repräsentiert die Flussgeschwindigkeit des Blutes im venösen System in vivo.

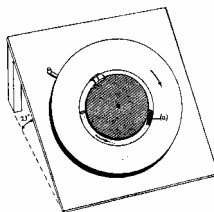


Abb. 2.2 : Original Chandler-Loop von 1958, Darstellung des zum Kreis geschlossenen Kunststoffschlauches, zentriert auf einer geneigten Drehvorrichtung.

Die Pfeile bedeuten die Drehrichtung der Scheibe bzw. des Blutes. a = vorderes Ende der Blutsäule und Bereich der Thrombusbildung

Es erfolgte eine Relativbewegung des Schlauches entgegengesetzt der Drehrichtung und die rechnerische Fließgeschwindigkeit des Blutes betrug dabei 425 cm pro Minute. Die Durchführung des Tests erfolgte bei Raumtemperatur. Chandler überließ den Versuch solange sich selbst, bis sich am vorderen Ende der Blutsäule ein Thrombus gebildet hatte. War der Thrombus groß genug geworden um das Lumen des Schlauchs auszufüllen, wurde die bis dahin noch im unteren Teil des Schlauches stationäre Blutsäule zur Mitbewegung in Rotationsrichtung gezwungen. Chandler definierte diesen Zeitpunkt als „formation time“.

Sein Versuchsmodell fand großen Anklang. Engelbergs demonstrierte 1969 dass Thrombinbildung und Gerinnung die Hauptmechanismen der Gerinnsel- und Thrombusentstehung sind, wenn Blut im Chandler-Loop rotiert und dass die Plättchenaggregation sekundär zur Thrombinbildung ist (17). Gardner versuchte 1974 eine technisch-physikalische Standardisierung des Chandler-Loops hinsichtlich der Einflüsse der Schlauchgeometrie, der Drehgeschwindigkeit und der Temperatur zu empfehlen. Auch die Zusammenhänge zwischen der Thrombusbildungszeit und Einflüssen auf das im Versuch verwendete Blut (Lagertemperatur des Blutes, Zeit zwischen Blutabnahme und Beginn der Rotation) wurden evaluiert (19) . Andere Autoren richteten ihr mikroskopisches und makroskopisches Augenmerk auf die Zusammensetzung der entstehenden Thromben (roter / weißer Thrombus).

Es wurde auch erkannt, dass der Chandler-Loop ein geeignetes Mittel zur Untersuchung von Antikoagulantien in Vollblut oder plättchenreichem Plasma ist, sowie für Studien über hereditäre Gerinnungsstörungen und thrombolysierende Substanzen (43) , (70) . Für die Evaluierung von Lyseverfahren wurden so „standardisierte“ Thromben hergestellt.

Der Chandler-Loop findet bis heute in modifizierter Form Anwendung in der Forschung. Ein Beispiel ist der Einfluss der Oberflächen von in die Blutbahn bzw. den Loop eingebrachten Stents auf die Gerinnungsaktivierung und die Anheftung von Zellen des Blutes auf diese Fremdoberfläche.

Der modifizierte Chandler-Loop mit dessen Hilfe die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, hat mit Chandlers ursprünglicher Konstruktion nur noch den rotierenden, mit

Blut gefüllten Kunststoffschlauch gemeinsam. (Siehe Kapitel - Der modifizierte Chandler-Loop)

2.4.1.2 Chandler Loop II (modifiziert)

Heller und Wendel entwickelten 1993 in Anlehnung an das Original des Chandler-Loop eine modifizierte Version des Gerätes, die ebenfalls der Untersuchung gerinnungsphysiologischer Vorgänge dient. Ziel war es, den Vorgang des Kontakts zwischen Blut und unphysiologischen Oberflächen, wie er beim Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine auftritt, möglichst realistisch in vitro nachzubilden, um auch die Beobachtung von Phänomenen abseits der klassischen Gerinnungsforschung, z.B. die Veränderungen von Plasmaproteinen und korpuskulären Blutbestandteilen, zu ermöglichen.

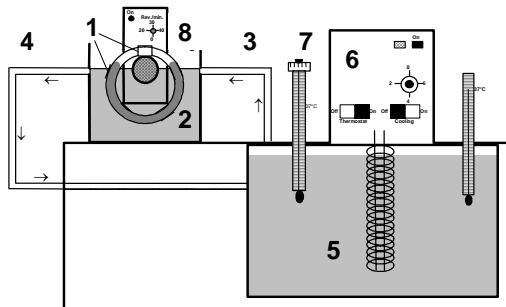


Abb. 2.3 : (1) mit Blut gefüllter Kunststoffschlauch, auf einer Walze rotierend (2) Wasserbad (3), (4) Zu- und Abfluss des temperierten Wassers (5) Wasservorrat und Heizspirale (6) Steuergerät des Kryostaten (7) Kontaktthermometer mit Impulsgeber und Temperaturvorwahl (8) Wellengehäuse mit Antriebswelle und Geschwindigkeitsvorwahl

Die Ringe / Loops aus Kunststoffschläuchen werden jetzt senkrecht in einem Wasserbad rotiert. Durch einen angeschlossenen Kryostaten erfolgt eine Temperaturregulierung des Wassers mit der Möglichkeit der Simulation einer Norm- bzw. Hypothermie, die das Blut auch bei der realen extrakorporalen Zirkulation erfährt. Für hypothermische Zustände im Wasserbad dient eine

Kompressorkältemaschine, während die normo- und hypertherme Umgebung durch eine Heizung nach dem Prinzip eines Tauchsieders im Wasservorratsbehälter erzeugt werden. Die Einstellung der gewünschten Temperatur erfolgt durch ein einstellbares Kontaktthermometer, das mit dem Steuergerät verbunden ist.

Die Rotationsgeschwindigkeit kann auf fünf Stufen zwischen 10 und 30 Umdrehungen pro Minute eingestellt werden. Die resultierende Fließgeschwindigkeit des Blutes liegt somit bei einer Schlauchlänge von 501mm zwischen 8, 35 und 25, 05 cm pro Sekunde. Diese Blutströmungsgeschwindigkeiten treten auch im Bereich der menschlichen Aorta bis hin zu den Endästen der großen Arterien auf (69) , (88) . Den Antrieb übernimmt ein im Wellengehäuse integrierter Gleichstrommotor.

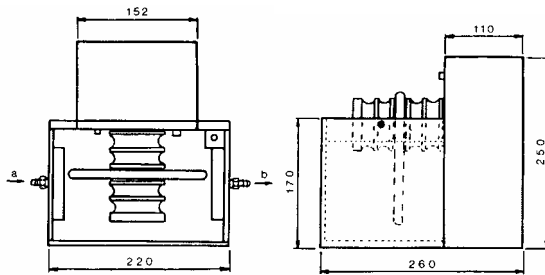


Abb. 2.4 : links : Modifizierter Chandler-Loop in der Draufsicht rechts : Modifizierter Chandler-Loop in der Seitenansicht, beide ohne Kryostat

2.4.1.3 Chandler-Loop III (erweitert)

1997 wurde der Modifizierte Chandler-Loop erweitert. Ein größeres Wasserbad und eine längere Welle für die rotierenden Schläuche ermöglichten eine größere Anzahl gleichzeitig durchzuführender Versuche. Die neue Befestigung für die Schläuche über 4 quadratisch angeordnete Stahlstäbe erlaubt nun auch Versuchsdurchläufe mit verschiedenen Schlauch-Radien und die Befestigung anderer Hohlkörper wie z.B. Konnektoren für Versuche unter Rotationsbewegung (Rocking Platform).

2.4.2 Die Loops (Ringe) des Chandler-Loops

Durch die Verwendung von ringförmig zusammengefügt Kunststoffschläuchen, in denen das Blut während der Durchführung des Versuchs zirkuliert, wird der Kontakt mit der Fremdoberfläche hergestellt. Um eine definierte Innenoberfläche des Schlauchs von 150 cm^2 zu erreichen beträgt die Schlauchlänge 501 mm . Die Schlauchmaße von $\frac{3}{8}'' \times \frac{3}{32}''$ (Innendurchmesser \times Wandstärke) sowie die Schlauchmaterialien entsprechen den Parametern, die auch beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine vorgefunden werden.

Der Schlauch wird mit einem etwa 4 cm langen überlappenden Silikonschlauch, mit entsprechend größerem Innendurchmesser, kreisförmig verschlossen. Präzisionsgeschnittene Enden des zu prüfenden Schlauchs sollen eine optimale Adaption der Enden ermöglichen.

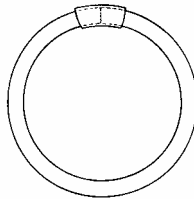


Abb.2.5 : Ringförmig verschlossener Schlauch (Loop) zur Verwendung im modifizierten Chandler-Loop

Diese Art der Verbindung kann jederzeit geöffnet werden, wodurch eine Zugabe oder Entnahme von Material während einer kurzen Unterbrechung der Rotation möglich ist. Auf diese Weise kann eine Kinetik der zu untersuchenden Ereignisse im Schlauch zu beliebigen Zeitpunkten erfolgen.

2.4.4 Übergabe des Blutes in die Chandler-Loops

Jeder Schlauch für den Versuchsdurchgang wurde unmittelbar nach Gewinnung und Pooling des Blutes mit 20 ml des mit 1 IU/ml heparinisiertem Vollblutes befüllt und als

Ring verschlossen. Danach wurden die Loops in den Chandler-Loop eingebracht, befestigt und die Rotation für die definierten Zeiten gestartet.

Sollen Proben zu mehreren Zeiten abgenommen werden, wird für jeden dieser Zeitpunkte ein eigener Ring gestartet um Aktivierungen während dem sonst nötigen Öffnen und Schließen eines Loops zur Blutentnahme zu verhindern. Eine Bestimmung mit den Rotationsdauern 60min und 120min bei zwei Schlauchtypen besteht somit aus 4 Loop (Heparinschlauch 60min, Heparinschlauch 120min, PVC-Schlauch 60min, PVC-Schlauch 120min).

2.4.5 Einstellungen des Modifizierten Chandler-Loops während der Simulation einer extrakorporalen Zirkulation in vitro

Die Loops rotieren mit 10 Umdrehungen pro Minute durch das normotherme (37°C) Wasserbad. Die Kombination der Rotationsgeschwindigkeit und der Schlauchlänge von 501 mm ergibt eine Fließgeschwindigkeit des Blutes im Schlauch von 8,35 cm / Sekunde relativ zur Schlauchoberfläche. Diese Geschwindigkeit entspricht in etwa jener, mit der sich das Blut unter physiologischen Bedingungen innerhalb der Endabschnitte von Hauptarterienästen des Gefäßsystems bewegt.

2.4.6 Probenvorbereitung (Substratgewinnung) nach Chandler-Loop

Nach Ablauf der Rotationszeiten wird der entsprechende Schlauch geöffnet und das Blut in Monovetten überführt. Um weitere Aktivierungen zu unterbinden enthalten diese Monovetten 10U Heparin/ml. Weiterhin wird ETDA-Blut entnommen und für die Zellzählungen verwendet. Die gewonnenen Proben werden sofort der weiteren Bearbeitung zugeführt.

2.5.0 Übersicht des Analysevorgangs

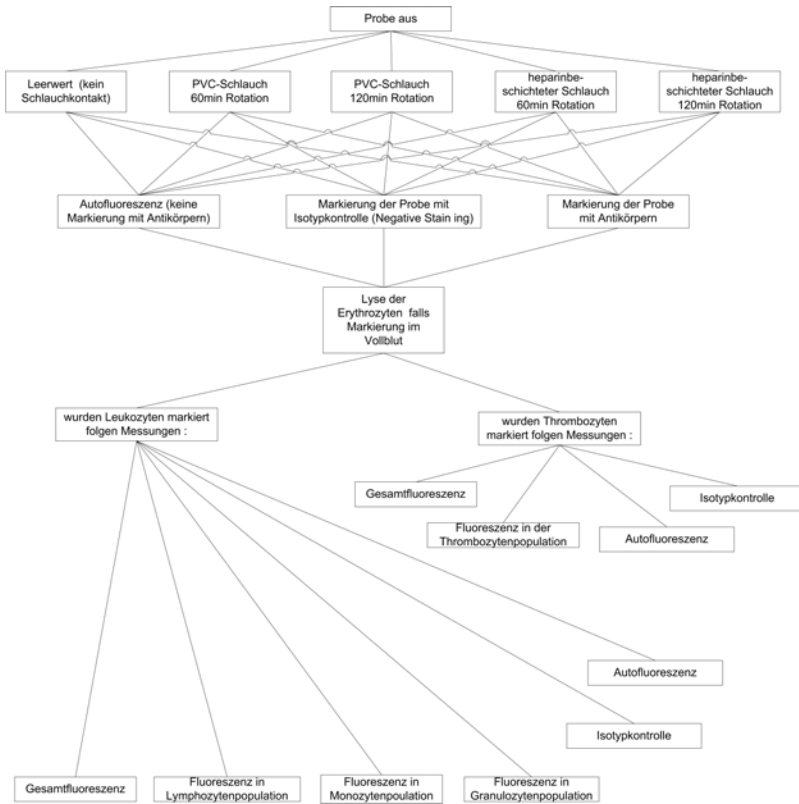


Abb. 2.6 : Übersicht des Analysevorgangs

2.6.0 Vorbereitende Untersuchungen

Den eigentlichen Bestimmungen gingen ausgiebige Vorversuche voraus, die keinen Einfluss in die endgültigen Messreihen haben. Mit diesen Vorversuchen wurden die technischen Schwierigkeiten der Methoden und der dazugehörigen Messungen evaluiert und Störfaktoren, insbesondere bei der durchflußzytometrischen Messung, ausgeräumt. Weiterhin wurden Erfahrungswerte hinsichtlich der Geräteeinstellungen und der Haltbarkeit der Proben, sowie deren Messwertänderungen bei

verschiedenen Lagerungen gesammelt. Die letztlich gültigen Messreihen wurden im Anschluss an die Vorversuche en-bloc durchgeführt. Die Geräteeinstellungen, insbesondere die des Durchflußzytometers, blieben dabei für die gesamte Versuchsreihe einer Analysemethode gleich und wurden nicht mehr verändert. Bei den Messreihen, die in die endgültige Wertung eingingen, wurden alle Werte erfasst. Ausreißer sind darin enthalten. Für jede Methode wurde ein Minimum von sechs Messvorgängen durchgeführt, im Mittel 10 Versuchsvorgänge. Geringe Fallzahlen erklären sich durch die Verwendung von Reagenzien, die Firmen teilweise als Proto-/Versuchstypen zur Verfügung gestellt haben und die für weitere Versuche nicht nachbestellt werden können (Beispiel: CellProbe – Peroxidase, CellProbe – Kallikrein).

2.7.0 Übersicht aller angewandten Tests

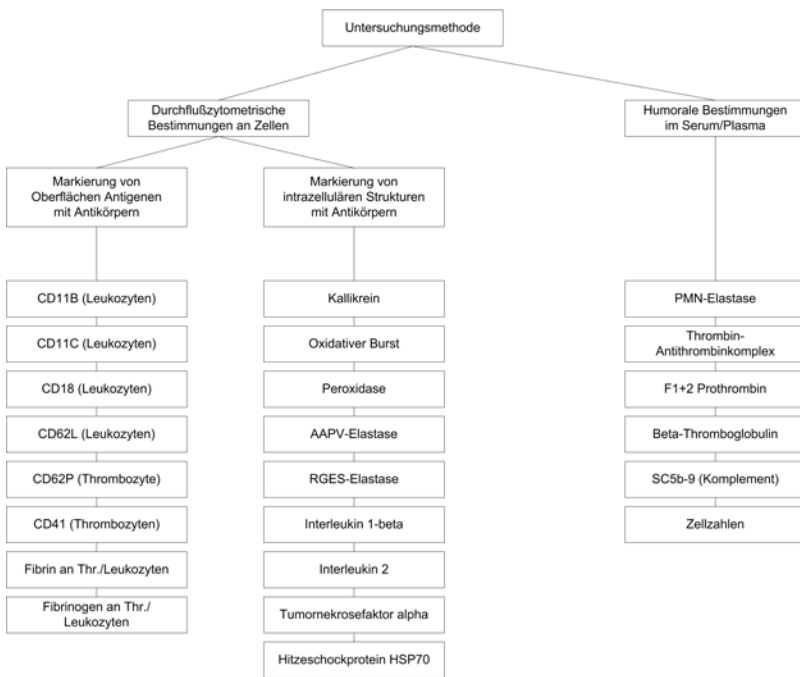


Abb. 2.7 : Übersicht der angewandten laborchemischen und immunologischen Tests

2.8.0 Vorstellung und Evaluation verschiedener Lyseverfahren für Vollblut

2.8.1 Vorbemerkungen

Lyseverfahren dienen vor der durchflußzytometrischen Analyse der Erythrozytenlyse nach direkter Immunfluoreszenzfärbung von Zellen aus peripherem Humanblut mit monoklonalen Antikörpern. Ergebnis nach dem Lysevorgang ist eine für die Durchflußzytometrie geeignete Leukozyten-/Thrombozytensuspension. Die Erythrozytenlyse kann durch eine Reihe chemischer und physikalischer Methoden erreicht werden, bei denen die Leukozyten intakt bleiben (50). Bei der durchflußzytometrischen Messung ist jedoch ausschlaggebend, dass die Zelltrümmer der Hämolyse nicht die Darstellung der Zelllinien beeinträchtigen. Im diesem Zusammenhang sind die der Lyse folgenden Wasch-/Reinigungsschritte besonders wichtig. Lyse-Reagenzien, die auf Waschschrte verzichten (No-Wash) bieten den Vorteil eines geringeren Zellverlust aus dem Ansatz gegenüber Reagenzien mit Waschschrten, belassen jedoch die Zelltrümmer der lysierten Erythrozyten in der Suspension. Der Einfluß dieser Zelltrümmer wird wiederum von deren Größe bestimmt, was einem Kriterium für die Auswahl eines No-Wash-Lysereagenzes bedeutet.

2.8.2 FACS Lysing Solution

2.8.2.1 Beschreibung des Tests und Funktionsprinzip

Bei der FACS-Lysing-Solution handelt es sich um ein Reagenz, welches durch Störung des osmotischen Gradienten einen Wassereinstrom in die Erythrozyten bewirkt. Dies wird wahrscheinlich durch eine partielle Zerstörung der Membranintegrität bewirkt. Einströmendes Wasser führt dann zum Platzen der Erythrozyten. Die entstandenen Fragmente sind von unterschiedlicher Größe und müssen durch Reinigungsschritte aus dem Ansatz entfernt werden, um eine durchflußzytometrische Messung störungsfrei durchführen zu können.

2.8.2.2 Methode

Die FACSTM-Lysing Solution, Produkt # 92-0002 (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wird vor Gebrauch vom 10-fach-Konzentrat auf eine gebrauchsfähige Konzentration verdünnt, indem 1ml FACSTM-Lysing Solution mit 10ml Aqua dest. gemischt werden. Folgende Reagenzien werden selbst vorbereitet : 0,5%-Paraformaldehyd aus 2,7ml Formaldehyd (37% Reagenzgrad) und 197,3ml Trägerflüssigkeit Ultracount (Hämatologisches Verdünnungsmittel (Clay-Adams #2483), Lagerung bei Raumtemperatur, Verbrauch innerhalb von 10 Tagen. PBS mit 0,1% Natriumazid mit Filterung durch einen 2µm-Filter (Lagerung bei 4°C, Verbrauch innerhalb von 7 Tagen). In jeden Ansatz werden nach der Inkubationszeit der monoklonalen AK (Volumen ca. 120µL) 2ml FACSTM-Lysing Solution gegeben und der Ansatz bei niedriger Drehzahl mit dem Vortex für drei Sekunden durchmischt. Es folgt eine Inkubation unter Lichtschutz bei Raumtemperatur für 10 Minuten. Die hellrot gefärbte Suspension wird anschließend für 10min bei 300G unter Kühlung zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Einmal-Glaspipette ohne Aufwirbelung des Sediments bis ein Volumen von 50µL im Probenröhrchen abgesaugt und das Sediment durch Zugabe von 1ml 1-fach-PBS mit 0,1% Natriumazid resuspendiert. Nach kurzem Vortex der Lösung bei niedriger Rotation wird der Lyseansatz für 5min bei 300G unter Kühlung zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Einmal-Glaspipette ohne Aufwirbelung des Sediments entfernt bis ein Volumen von 50µL im Probenröhrchen übrig ist. Die Probe wird durch Zugabe von 0,5ml 0,5%-Paraformaldehyd fixiert und bis zur durchflußzytometrischen Bestimmung unter Lichtschutz auf Eis gelagert. Zur Optimierung der Zellzahl in der Suspension wird der Ansatz vor und nach der Lyse im Zell-Counter auf seinen Leukozytenanteil gezählt. Nach Färbung mit Fluorochromen / markierten monoklonalen Antikörpern und Lyse können die Ansätze bis max. 24h bei 2-8°C unter Lichtschutz aufbewahrt werden.

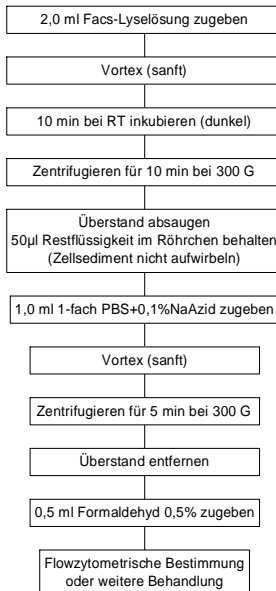


Abb. 2.8 : Lysemethode nach Markierung des Ansatzes mit Antikörpern und Inkubation

2.8.2.3 Messung

Das Messergebnis wird auf Grundlage der optischen Darstellung der Messung beurteilt. Im Idealfall ergeben sich klar abgrenzbare Bereiche für Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten ohne störenden Debris (Zelltrümmer). Falls die Messung durch Debris gestört wird, muss der „Verschmutzungsbereich“ durch Einstellung der Volt-Werte für Forward- und Sideward-Scatter in die Region nahe dem Koordinatenursprung abgedrängt werden. Durch die Vielzahl der Ansätze bei stets gleicher Prozedur der Lyse, lassen sich verlässliche und qualitativ hochwertige Messungen erreichen.

2.8.3 OptiLyse B

2.8.3.1 Beschreibung des Tests und Funktionsprinzip

OptiLyse B, Nr. IM1400 (Fa. Coulter, Krefeld, Deutschland) ist ein Reagenz für die Lyse von Erythrozyten für die durchflußzytometrische Messung von Proben auf Becton-Dickinson-Durchflußzytometern (FACS-Scan). Es handelt sich eine NoWash-Lyse, die auf Waschschritte nach der Lyse verzichtet und gleichzeitig eine Fixierung der Zellen bewirken soll. Die Lyse mit dem Reagenz Opti-Lyse™ B beruht auf einer Störung des intra- und extrazellulären osmotischen Gradienten der Erythrozyten. Ein Wassereinstrom nach den erzeugten osmotischen Gradienten zerstört als Folge die Zelle.

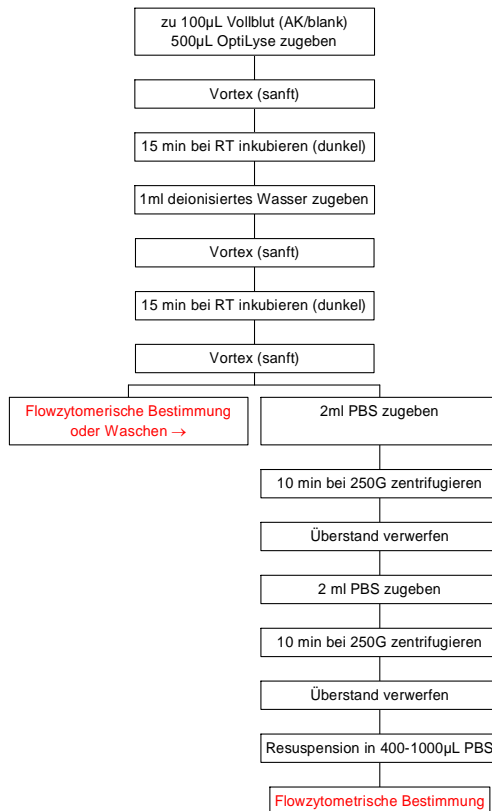


Abb. 2.9 : Methode OptiLyse B nach Markierung des Ansatzes mit Antikörpern und Inkubation

2.8.3.2 Methode

Zu 100µL Vollblut werden nach der Markierung mit monoklonalen Antikörpern 500µL OptiLyse™ B zugeben und sofort 10sec mit hoher Rotation mit dem Vortex gemischt. Es folgt eine Inkubation des Ansatzes für 10-120min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Nach Zugabe von 500µL PBS erfolgt eine weitere Inkubation von 10-120min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Die Probe kann anschließend nach kurzem Vortex durchflußzytometrisch gemessen werden.

2.8.4 OptiLyse C

2.8.4.1 Beschreibung des Tests und Funktionsprinzip

OptiLyse C Nr. IM1401(Fa. Coulter, Krefeld, Deutschland) ist ein Reagenz für die Lyse von Erythrozyten für die durchflußzytometrische Messung von Proben auf Coulter-Durchflußzytometern. Es handelt sich eine NoWash-Lyse, die auf Waschschrte nach der Lyse verzichtet und gleichzeitig eine Fixierung der Zellen bewirken soll. Die Methode wurde mit und ohne weitere Waschschrte getestet. Die Lyse mit dem Reagenz Opti-Lyse™ C beruht auf einer Störung des intra- und extrazellulären osmotischen Gradienten der Erythrozyten. Ein Wassereinstrom nach den erzeugten osmotischen Gradienten zerstört als Folge die Zelle.

2.8.4.1.1 No-Wash-Methode

Zu 100µL Vollblut werden nach der Markierung mit monoklonalen Antikörpern 500µL OptiLyse™ C zugeben und sofort 10sec mit hoher Rotation auf dem Vortex gemischt. Es folgt eine Inkubation des Ansatzes für 10-120min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Nach Zugabe von 500µL PBS erfolgt eine weitere Inkubation von 10-120min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Die Probe kann anschließend nach kurzem Vortex gemessen werden.

2.8.4.1.2 Wash-Methode

Der No-wash-Methode kann ein Reinigungsschritt nachgestellt werden. Dieser ist erforderlich, wenn Proben mit starker unspezifischer Bindung untersucht werden sollen. Dem bereits lysierten Ansatz werden 3ml PBS zugegeben und der Ansatz 10min bei 250G und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands mit einer Glas-Einmalpipette wird das Zellpellet in 3ml PBS-Puffer resuspendiert und erneut 10min bei 250G Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird ohne Aufwirbelung des Sediments entfernt und mit 1ml PBS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung auf Eis unter Lichtschutz gelagert.

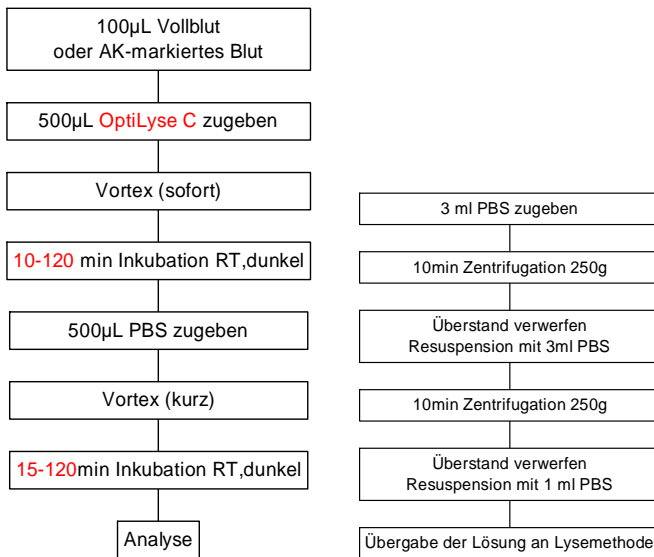


Abb. 2.10: links OptiLyse C-Verfahren, rechts Verfahren für vorgesezte Reinigung der Suspension vor der Lyse falls erforderlich

2.8.5 OthoMune Lysing Solution

2.8.5.1 Beschreibung des Tests und Funktionsprinzip

Ortho-Mune™-Lysing Solution (Ortho Pharma, Salt Lake City, USA) lysiert Erythrozyten durch vermehrten Ammonium-Chlorid-Einstrom durch die Erythrozytenmembran. Diese Ammonium-Chlorid-Ionen verschieben den

osmotischen Druckgradienten und es kommt zur Ruptur der Membran der Erythrozyten bei nachfolgendem Einstrom von Wasser.

2.8.5.2 Methode

Ortho-Mune™-Lysing Solution wird vor der Verwendung rekonstituiert : Der gekühlt gelagerte Puder wird auf Raumtemperatur erwärmt und in 100ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH der entstandenen Lösung wird mit KHCO_3 und NH_4Cl auf 7,2-7,4 eingestellt. Die fertige LyseLösung wird innerhalb von sieben Tagen verbraucht und bei Raumtemperatur gelagert. Es kommt folgende Lysemethode zur Anwendung
Nach der Markierung mit monoklonalen Antikörpern und Inkubation wird einer Probe von 200µL Vollblut wird 2,0ml Lysing Solution zugegeben und der Ansatz sofort bei hoher Rotation für 5sec mit dem Vortex gemischt. Es folgt die Inkubation bei $25^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ für 15 Minuten unter Lichtschutz. Die Lösung erscheint nun rötlich transparent. Sollte dies nicht der Fall sein, wird der Ansatz bei 400G für 5min gekühlt ($2-8^\circ\text{C}$) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, 2ml Lysing Solution zugegeben und wieder inkubiert. Bei transparentem Erscheinen wird der Ansatz 5min bei 400G gekühlt ($2-8^\circ\text{C}$) zentrifugiert und der Überstand entfernt ohne das Sediment aufzuwirbeln. Das Sediment wird in 1ml PBS mit 2% Serum (hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum) resuspendiert und bis zur durchflußzytometrischen Analyse auf Eis unter Lichtschutz gelagert. Alternativ findet die Resuspendierung mit 0,5ml 0,5%-PBS statt. Die Analyse wird innerhalb der folgenden 2 Stunden vorgenommen oder der Ansatz nach 24h verworfen.

2.9.0 Methoden und Messungen der durchflußzytometrisch messbaren Aktivierungsmarker

2.9.1 CD11B

2.9.1.1 Eigenschaften des CD 11B-Antigens

CD 11b ist ein transmembranäres Glykoprotein (Oberflächenmarker) der im menschlichen Vollblut auf etwa 30% der peripheren Blutlymphozyten präsentiert wird, ebenso auf einer Teilpopulation der T-Zellen, sowie auf Granulozyten, Monozyten und natürlichen Killerzellen (NK). In Geweben wie Haut und Tonsillenparenchym ist CD 11b lediglich auf Makrophagen nachweisbar. Es handelt sich um ein

heterodimeres Glykoprotein in enger Nachbarschaft mit dem CD 18-Antigen-Komplex und gehört zur Familie der β 2-Integrine. Die Komplexe CD11b und CD 18 sind örtlich miteinander assoziiert, jedoch nicht kovalent verbunden. Dennoch wird für die Expression von des CD 11b-Antigens die Präsenz von CD 18 vorausgesetzt. Das CD 11b-Antigen wird synonym als Mac-1, CR3, MO-1 oder C3bi-Rezeptor bezeichnet. Der CD11B/CD18-Komplex findet sich in nicht-aktivierten Granulozyten in subzellulären Granula und wird bei Aktivierung an die Zelloberfläche verschoben, wobei die Exprimierung des Komplexes an die Zelloberfläche sowohl funktionell als auch quantitativ im Sinne einer Up-Regulierung erfolgen kann. Als Mitglied der β 2-Integrinfamilie der Adhäsionsmoleküle vermittelt der Rezeptor die Bindung von Granulozyten und Monozyten an das vaskuläre Endothel. Weitere CD 11b-Liganden sind ICAM-1 (CD549), Faktor X (Stuart-Prower-Faktor) , Fibrinogen, sowie Endotoxine. CD11B und CD18 sind in eine Reihe von Zell-Zell- und Zell-Substrat-Interaktionen eingebunden, so der Anheftung und Phagozytose von Partikeln, die von Granulozyten bzw. Makrophagen mit C3bi markiert wurden oder der Phagozytose von opsonierten pathogenen Zellen. Weiterhin spielt der Komplex eine Rolle in der Aktivierung der Kaskade der Gerinnungs-Proteasen sowie während Vorgängen der Zell-Migration. In Zellen des Endothels stellt ICAM-1 den Rezeptor für CD11B/CD18 dar. CD 11b weist insgesamt 19 mögliche Orte einer reaktiven N-Glykolysierung im Rahmen der Aktivierung auf. Die Markierung des CD 11b/CD 18-Komplexes diente bisher Untersuchungen der Zell-Adhäsion und Migration, der Aufdeckung und Beobachtung von Störungen der Leukozytenbindung, sowie Adhäsionsbeobachtungen in Gerinnungsstudien

2.9.1.2 Eigenschaften des CD11B-Antikörpers

Der CD11B-Antikörper der Fa.Sigma, St.Louis, USA, Nr. R-3638, Clone 44 ist für die Durchflußzytometrie mit dem Tandemfluorochrom QuantumRed konjugiert. Dieses Tandemfluorochrom besteht aus R-Phycoerythrin und Cy5. Es absorbiert Lichtenergie bei 488nm und emittiert im Anregungsbereich von Cy5, welches als Akzeptorfarbstoff dient. Der gesamte Komplex emittiert schließlich bei 670nm. Der Antikörper wird immunologisch der Klasse IgG1 der Maus zugeordnet und der Ansatz wird mit dem einem Produkt des gleichen Herstellers einer Negative-Staining-Kontrolle unterzogen (Mouse-IgG1-QuantumRed Nr. R-2138, Fa. Sigma).

2.9.1.3 CD 11B – Geräteeinstellung & Messung

Die Messung der Probe erfolgt mit dem Coulter EPICS XL/MCL- Durchflußzytometer. Vor dem Starten der Messung werden die bis dahin auf Eis gelagerten Proben für ca. 2sec. schonend mit dem Vortex durchmischt um auf den Boden des Proberöhrchens sedimentierte Zellen wieder in Lösung zu bringen.

Das Durchflußzytometer wird mit folgenden Messparametern auf die Messung vorbereitet. Der Protokollname der Datei für diese Einstellung lautet Z0001196.pro.

Die Flussrate wird auf high / hoch eingestellt. Im ersten Histogramm (1) wird das Ende der Messung (STOP) mit 20.000 erfassten Zellen eingestellt. Die Auflösung des Histogramms beträgt 1024 x 1024 Channels. Als Parameter für die Detektion der Zellen werden der Forward Scatter auf einen Wert von 350 Volt bei einem Gain von 5,0 eingestellt, was eine totale Verstärkung des Signals von 10,25 ergibt. Für den Sideward Scatter werden 590 Volt bei einem Gain von 7,5 mit einer resultierenden Totalverstärkung von 20,78 vorgegeben. Die Detektion der Fluoreszenzen wird für den Bereich des beim Antikörper CD 11C verwendeten PE-Farbstoff im FL3-Detektor mit 1030 Volt bei einem Gain von 1,0 vorgegeben. Da in der gleichen Messung auch der FITC markierte Antikörper CD 62 L erfasst wird der Detektor FL1 für grüne Fluoreszenz ebenfalls aktiviert und mit dem Wert 762 Volt bei einem Gain von 1,0 eingestellt. Zwischen den beiden Fluoreszenzen wird wie folgt kompensiert : FL1 = FL1 – 0,9% von FL2 und FL3 = FL3 – 6% von FL2. Als Diskriminator ist der Forward Scatter auf Channel # 30 aktiviert und das ListmodeGating ist deaktiviert. Diese Einstellungen werden für alle Messungen einer Versuchsreihe beibehalten.

2.9.2 CD11C

2.9.2.1 Eigenschaften des CD 11C-Antigens

Das CD11c-Antigen ist Mitglied der Familie der Integrine und wird synonym als alphaX-Integrin-Subunit oder Leukozyten-Oberflächen-Antigen p150, bzw. als C3bi oder C3dg R „CR4“ bezeichnet, wobei als CR4 nach momentanem Stand als Komplement-Rezeptor Typ 4 angesehen wird. Wie die anderen leukozyten-assoziierten Integrine (CD11a, CD11b, CD11d) steht es nicht-kovalent mit dem beta2-Integrin-Subunit in räumlichen Kontakt. Diesem beta-2-Integrin-Komplex lässt

sich auch das ebenfalls untersuchte CD18 zuordnen. Das Antigen ist einer Gruppe von heterodimeren, intrazellulären und zell-matrix- assoziierten Adhäsionsrezeptoren zuzuordnen (6) . Von CD11c-Antigen existieren Untergruppen, deren gemeinsames Merkmal eine einheitliche β -Kette ist und die sich in der Zusammensetzung ihrer α -Ketten unterscheiden. Bei CD11c handelt es sich um ein transmembranäres Glykoprotein mit einem Gewicht von 145-150 kD, das hauptsächlich auf Monozyten, Gewebemakrophagen und natürlichen Killerzellen präsent ist (85) . Ebenfalls ist seine Anwesenheit auf der Oberfläche von Granulozyten, dendritischen Zellen und Untergruppen der B- und T-Zell Lymphozyten nachweisbar. Eine erhöhte Expression des CD11c-Antigens wurde bei der lymphozytären Form der chronischen B-Zell Leukämie beobachtet (9) (3) , sowie auf den spezifischen Zellen bei Haarzell-Leukämie.

2.9.2.2 Eigenschaften des CD 11C-Antikörpers

Der verwendete CD11c-Antikörper der Fa. Coulter-Immunotech, Krefeld, Deutschland, # 1760 gehört der Immunklasse IgG1 an und wird durch Hybridisierung von myeloischen Milzzellen (NS1/Ag 4.1 x Balb/c-Zellen) der Maus nach Immunisierung gewonnen. Zum Einsatz kommt der Klon BU15. Eine entsprechende Isotyp-Kontrolle (Negative Staining) wird mit einem Produkt der gleichen Reihe durchgeführt (Mouse IgG1-PE IO-Test # 0670 der Fa. Coulter Immunotech, Krefeld, Deutschland).

2.9.2.3 Markierung des Antikörpers für die Durchflußzytometrie

Der CD11c-Antikörper der Fa. Coulter-Immunotech # 1760 ist mit dem Fluorochrom Phycoerythrin konjugiert. Das Fluorochrom wird mit einer Wellenlänge von 486-575nm (488nm) angeregt und emittiert im Bereich von 568-590nm (578nm).

2.9.2.4 CD11C – Geräteeinstellung & Messung

Die Messung der Probe erfolgt mit dem Coulter EPICS XL/MCL- Durchflußzytometer. Vor dem Starten der Messung werden die bis dahin auf Eis gelagerten Proben für ca. 2sec. schonend mit dem Vortex durchmischt um auf den Boden des Proberöhrchens

sedimentierte Zellen wieder in Lösung zu bringen. Das Durchflußzytometer wird mit folgenden Messparametern auf die Messung vorbereitet. Der Protokollname der Datei für diese Einstellung lautet Z0001196.pro.

Die Flussrate wird auf High eingestellt und die Messung automatisch bei einer Zellzahl von 20.000 Zellen im Histogramm 1 beendet. Die Auflösung des Histogramms beträgt 1024 x 1024 Kanäle. Als Parameter für die Detektion der Zellen werden der Forward Scatter auf einen Wert von 350 Volt bei einem Gain von 5,0 eingestellt, was eine totale Verstärkung des Signals von 10,25 ergibt. Für den Sideward Scatter werden 590 Volt bei einem Gain von 7,5 mit einer resultierenden Totalverstärkung von 20,78 vorgegeben. Die Detektion der Fluoreszenzen wird für den Bereich des beim Antikörper CD 11B verwendeten PE-Markierung im FL2-Detektor mit 717 Volt bei einem Gain von 1,0 vorgegeben. Da in der gleichen Messung auch der FITC markierte Antikörper CD 18 erfasst wird der Detektor FL1 für grüne Fluoreszenz ebenfalls aktiviert und mit dem Wert 762 Volt bei einem Gain von 1,0 eingestellt. Zwischen den beiden Fluoreszenzen wird wie folgt kompensiert : FL1 = FL1 – 0,9% von FL2 und FL2 = FL2 – 20% von FL1. Als Diskriminator ist der Forward Scatter auf Channel # 30 aktiviert und das ListmodeGating ist deaktiviert. Diese Einstellungen werden für alle Messungen einer Versuchsreihe beibehalten.

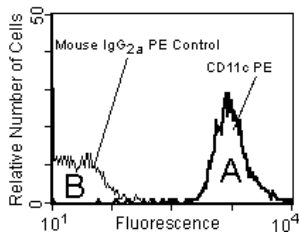


Abb. 2.11 : Ideale Fluoreszenzverteilung bei der Messung des PE-markierten CD 11C-Antikörpers (A) und der Isotypkontrolle (B)

2.9.3 CD18

2.9.3.1 Eigenschaften des CD18-Antigens

Das Epitop CD18 wird auf fast allen peripheren Leukozyten des menschlichen Blutes angetroffen. Es ist essentiell notwendig für eine große Anzahl von Vorgängen

innerhalb des Immunsystems, die auf Zell-zu-Zell-Kontakt basieren, wie beispielsweise der Lymphozytenadhäsion, der Zytolysefunktion von Natürlichen Killerzellen (NK) und T-Lymphozyten, sowie für die Proliferation von T-Lymphozyten. Das CD18-Epitop gehört der Familie der beta2-heterodimer-Integrine an und steht in enger Nachbarschaft mit dem Angriffsort für die ebenfalls in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten Antikörper CD11B und CD11C. Das Molekulargewicht beträgt 95 kDalton. CD18 ist eine beta-Kette des LFA-1 (Leukocyte-Function-Adhesion-Antigen-1), also eine Untergruppe der Integrin-Rezeptoren. Diese Untergruppe besteht aus drei Proteinen, die sich eine gemeinsame, nicht-kovalent gebundene, beta-Kette (LFA-1beta/CD18) teilen, aber eigene alpha-Untereinheiten besitzen: LFA-1alpha / CD11A (Molekulargewicht 180 kDalton), Leu15 / CD11B (Molekulargewicht 170 kDalton) und Leu-M5 / CD11C (Molekulargewicht 150 kDalton). Bei LFA-1 / CD18 handelt es sich wie erwähnt um einen Leukozyten-Adhäsionsrezeptor, der an interzelluläre Adhäsionsmoleküle am Zielgewebe binden kann und somit als ICAM (Intercellular Adhesion Molecule) klassifiziert ist. Die Aktivierung von Lymphozyten durch den T-Zell-Antigenrezeptor (TcR) bewirkt eine Up-Regulation der LFA-1/CD18-Funktion, wobei das Antigen in einen äußerst empfindlichen Zustand versetzt wird. Ebenso bewirkt die Präsenz von γ -Interferon eine Up-Regulation des LFA-1/CD18-Rezeptorepitops auf Monozyten. Durch die Integration des Antigens in die Immunvorgänge korreliert ein Fehlen des LFA-1/CD18-Epitops oder ein Fehlen der alpha- bzw. beta-Untereinheiten mit dem Schweregrad von bestimmten Leukämien, Lymphomen oder der LAD (Leucocyte Adhesion Deficiency). Interessanterweise könnte das Fehlen von LFA-1/CD18 auf Tumorzellen eine der möglichen Erklärungen für die Überlistung des Immunsystems durch die Tumorzellen sein.

2.9.3.2 Eigenschaften des CD18-Antikörpers

Der CD18/Anti-LFA-1beta-Antikörper der Fa. Beckton-Dickinson # 347953 (7953) erkennt die 95-Dalton beta-Kette des LFA-1 (Leukocyte Function Antigen-1).

Es handelt sich um den Klon L130, der durch Hybridisierung von myeloischen Sp2/0 Zellen der Maus mit Milzzellen BALB/c-positiver Mäuse, die mit aus Thymusgewebe stammenden T-Zell-Antigen-Rezeptor-(TCR-gamma)-positiven T-Lymphozyten immunisiert wurden, gewonnen wird. CD18/Anti-LFA-1 gehört zur IgG1-Gruppe der Spezies Maus und ist spezifisch gegen das menschliche Antigen gerichtet. Eine

Negative Staining/Isotyp-Kontrolle auf unspezifische Bindung wird mit dem entsprechenden Produkt der gleichen Reagenzreihe durchgeführt (Mouse IgG1-Isotypkontrolle #349041, FITC-markiert, Fa. Beckton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

2.9.3.3 Markierung des Antikörpers für die Durchflußzytometrie

Für die Bestimmung mit dem Durchflußzytometer wurde der Antikörper mit dem Farbstoff FITC markiert. FITC (Fluorescein) wird bei einer Wellenlänge von 495nm angeregt und emittiert Energie der Wellenlänge 525. Die im Kanal FL1 detektierte Wellenlänge entspricht der Fluoreszenz-Farbe grün.

2.9.3.4 CD18 – Geräteeinstellung & Messung

Die Messung der Probe erfolgt mit dem Coulter EPICS XL/MCL- Durchflußzytometer. Vor dem Starten der Messung werden die bis dahin auf Eis gelagerten Proben für ca. 2sec. schonend mit dem Vortex durchmischt um auf den Boden des Proberöhrchens sedimentierte Zellen wieder in Lösung zu bringen.

Das Durchflußzytometer wird mit folgenden Messparametern auf die Messung vorbereitet. Der **Protokollname** der Datei für diese Einstellung lautet Z0001196.pro. Die **Flussrate** wird auf high / hoch eingestellt. Im ersten Histogramm (1) wird das **Ende der Messung** (STOP) mit 20.000 erfassten Zellen eingestellt. Die Auflösung des Histogramms beträgt 1024 x 1024 Channels. Als Parameter für die Detektion der Zellen werden der **Forward Scatter** auf einen Wert von 350 Volt bei einem Gain von 5,0 eingestellt, was eine totale Verstärkung des Signals von 10,25 ergibt. Für den **Sideward Scatter** werden 590 Volt bei einem Gain von 7,5 mit einer resultierenden Totalverstärkung von 20,78 vorgegeben. Die Detektion der Fluoreszenzen wird für den Bereich des beim Antikörper CD18 (Anti-LFA-1beta) verwendeten FITC-Farbstoff im **FL1**-Detektor mit 762 Volt bei einem Gain von 1,0 vorgegeben. Da in der gleichen Messung auch der PE-markierte Antikörper CD11C erfasst wird der Detektor **FL2** für rote Fluoreszenz ebenfalls aktiviert und mit dem Wert 717 Volt bei einem Gain von 1,0 eingestellt. Zwischen den beiden Fluoreszenzen wird wie folgt **kompensiert** :

FL1 = FL1 – 20% von FL2 und FL2 = FL2 – 0,9% von FL1. Als **Diskriminator** ist der Forward Scatter auf Channel # 30 aktiviert und das ListmodeGating ist deaktiviert.

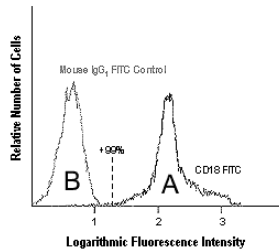


Abb. 2.12 : Ideale Fluoreszenzverteilung und Abgrenzung zwischen CD18-Antikörper (A) und der Isotypkontrolle (B), beide FITC-markiert.

Diese Einstellungen werden für alle Messungen einer Versuchsreihe beibehalten.

2.9.4 CD62L

2.9.4.1 Eigenschaften des CD62L-Antigens

Die Bezeichnungen CD62L und Anti-Leu-8 werden synonym für das gleiche Epitop verwendet. Bei Leu-8 / CD62L handelt es sich um ein Antigen, welches auf 68 +/- 7% aller Leukozyten im peripheren Blut präsent ist mit einer Antreffwahrscheinlichkeit von 70-80% auf T-Lymphozyten, zu 10% auf Thymozyten, sowie nahezu bei allen B-Lymphozyten. Eine Verminderung der Anti-Leu-8 / CD 62L- Aktivität korreliert mit der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten im Sinne einer Down-Regulierung. Antikörper gegen CD62L / Anti-Leu-8 können ebenfalls auf Monozyten, Granulozyten und Untergruppen von natürlichen Killerzellen (NK) binden. Durch die Bindung des Antikörpers werden demnach die regulatorisch aktiven Untergruppen der T-Zell-Reihe identifiziert, und zwar sowohl in den Leu2 / CD8- , als auch in den Leu3 / CD4- Untergruppen. Von den genannten Untergruppen sind etwa 75% der Leu3 / CD4- positiven T-Zellen und etwa 60% der Leu2 / CD8-positiven T-Zellen Bindungspartner des Anti-Leu-8-Antikörpers. Diese Leu-3 / CD4, bzw. Leu-8-positiven Zellen sind als regulatorische Mediatoren für die Hilfsfunktion bei der Produktion von Immunglobulinen gekennzeichnet, dies wird beispielsweise bei der Proliferation von

B-Zellen zu plaque-formenden Zellen Leu-2⁺ und Leu-8⁺ deutlich. Leu-8 / CD 62L-positive Zellen sind außerdem an der Suppression der Differenzierung von B-Zellen beteiligt.

2.9.4.2 Eigenschaften des CD62L-Antikörpers

Der verwendete Antikörper CD62L / Anti-Leu-8 # 7443 der Fa. Beckton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland wird durch Hybridisierung von NS-1-positiven Zellen der Maus mit Milzzellen BALB/c-positiver Mäuse gewonnen, die mit T-Lymphozyten des peripheren Blutes immunisiert wurden. Es handelt sich bei dem verwendeten Antikörper um den Klon SK 11. Die genotypische Herkunft des Antikörpers ist die Spezies Maus als Immunglobulin der Gruppe IgG_{2a}.

2.9.4.3 Markierung des Antikörpers für die Durchflußzytometrie

Der Antikörper ist FITC-markiert (Fluorescein) und wird durchflußzytometrisch mit dem Detektor FL1 des EPICS-XL gemessen ,wobei seine Exzitation (Anregungs-Wellenlänge) bei 495nm (488nm) und die Emissions-Wellenlänge bei 525nm liegt.

2.9.4.4 CD62L – Geräteeinstellung & Messung

Die Messung der Probe erfolgt mit dem Coulter EPICS XL/MCL- Durchflußzytometer. Vor dem Starten der Messung werden die bis dahin auf Eis gelagerten Proben für ca. 2sec. schonend mit dem Vortex durchmischt um auf den Boden des Proberöhrchens sedimentierte Zellen wieder in Lösung zu bringen. Das Durchflußzytometer wird mit folgenden Messparametern auf die Messung vorbereitet. Der Protokollname der Datei für diese Einstellung lautet Z0001196.pro. Die Flussrate wird auf high / hoch eingestellt. Im ersten Histogramm (1) wird das Ende der Messung (STOP) mit 20.000 erfassten Zellen eingestellt. Die Auflösung des Histogramms beträgt 1024 x 1024 Channels. Als Parameter für die Detektion der Zellen werden der Forward Scatter auf einen Wert von 350 Volt bei einem Gain von 5,0 eingestellt, was eine totale Verstärkung des Signals von 10,25 ergibt. Für den Sideward Scatter werden 590 Volt bei einem Gain von 7,5 mit einer resultierenden Totalverstärkung von 20,78 vorgegeben. Die Detektion der Fluoreszenzen wird für den Bereich des beim Antikörper CD62L (Anti-Leu8) verwendeten FITC-Farbstoff im FI1-Detektor mit 762

Volt bei einem Gain von 1,0 vorgegeben. Da in der gleichen Messung auch der PE-markierte Antikörper CD11C erfasst wird der Detektor FL2 für rote Fluoreszenz ebenfalls aktiviert und mit dem Wert 717 Volt bei einem Gain von 1,0 eingestellt. Zwischen den beiden Fluoreszenzen wird wie folgt kompensiert : $FL1 = FL1 - 20\%$ von $FL2$ und $FL2 = FL2 - 0,9\%$ von $FL1$. Als Diskriminator ist der Forward Scatter auf Channel # 30 aktiviert und das ListmodeGating ist deaktiviert. Diese Einstellungen werden für alle Messungen einer Versuchsreihe beibehalten.

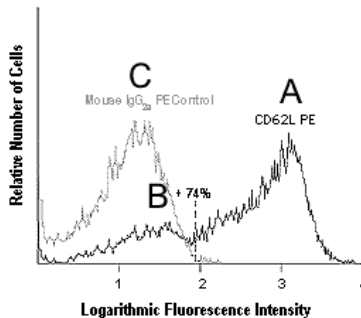


Abb. 2.13 : CD62L-Messung (A) mit Overlay der Autofluoreszenz (B) und der Isotypkontrolle (C)

2.9.5 Gemeinsame Methode für die Oberflächen-Antikörper CD11B, CD11C, CD18 und CD 62L

Bei den Oberflächenantikörper-Bestimmungen werden jeweils ein PE- und ein FITC-markierter Antikörper in einem Ansatz gemessen. Hierbei werden CD11B (PE) und CD18 (FITC), sowie CD11C (PE) und CD62L (FITC) kombiniert.

Für die durchflußzytometrische Messung der Parameter werden drei Probenansätze vorbereitet : Autofluoreszenzkontrolle, Negative Staining sowie die eigentliche Marker-Messung. Insgesamt kommen durch die zeitdifferente Abnahme des Blutes aus dem Chandler Loop und die Qualitätskontrollen folgende neun Proben zur weiteren Analyse :

- **Negative Staining-Kontrolle** aus dem Vollblut des Probanden, welches nicht am Chandler-Loop-Durchlauf teilgenommen hat (**Zeitpunkt 0**)
- **Negative Staining-Kontrollen** aus den 2 Schlauchtypen PVC und Heparin-Beschichtung jeweils zu den **Zeitpunkten 60min und 120min**.
- **Autofluoreszenz-Kontrolle** aus dem Vollblut des Probanden, welches nicht am Chandler-Loop-Durchlauf teilgenommen hat (**Zeitpunkt 0**)
- **Autofluoreszenz-Kontrollen** aus den 2 Schlauchtypen PVC und Heparin-Beschichtung jeweils zu den Zeitpunkten **60min und 120min**.
- **Antikörper-markierte Probe** aus dem Vollblut des Probanden, welches nicht am Chandler-Loop Durchlauf teilgenommen hat (**Zeitpunkt 0**)
- **Antikörper-markierte Proben** aus den 2 Schlauchtypen PVC und Heparin-Beschichtung jeweils zu den Zeitpunkten **60min und 120min**.

Hierbei werden die Proben des Zeitpunktes 0 Minuten sofort bearbeitet, während die Proben der Zeitpunkte 60 Minuten (nach sofortiger Zugabe von 1 E Heparin pro 100µL Vollblut sowie Durchmischung und Lagerung auf Eis) und 120 Minuten gemeinsam weiterbearbeitet werden.

Für die **Autofluoreszenz-Kontrolle** werden 100µL Vollblut 1 Einheit Heparin zugegeben. Nach weiterer Verdünnung mit Diluent (0,01M PBS pH 7,4 mit 1% BSA und 0,1%NaN₃) wird die Probe für ca. 5 Sekunden bei niedrigen Umdrehungen im Vortex gemischt, worauf eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz folgt. Nach Lysierung der Erythrozyten mit FACS Lysing Solution und dreimaligem Waschen der Probe wird für die endgültige Reinigung des Ansatzes 2ml Diluent (0,01M PBS pH 7,4 mit 1% BSA und 0,1%NaN₃) zugegeben und die Probe für 10min bei 1400rpm zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und 0,5ml 2%-Paraformaldehyd-PBS als Fixierung zugegeben. Lagerung der Autofluoreszenz-Kontrolle erfolgt auf Eis unter Lichtschutz bis zur Messung.

Bei der **Negative Staining** Kontrolle (Isotyp-Kontrolle) wird 100µl Vollblut 1 Einheit Heparin zugeben und durchmischt. Im Ansatz für CD11B / CD18 erfolgt die Zugabe von 10µL Mouse-IgG1 (MOPC-21) QuantumRed Conjugate der Fa. Sigma (# R-2138), sowie µL Mouse-IgG1-Isotypkontrolle FITC # 349041 der Fa. Beckton-Dickinson. Dem Ansatz CD11C/CD62L werden 10µL Mouse IgG1 PE IO-Test # 0670 Clone 679.1Mc1 der Fa. Coulter Immunotech und Mouse IgG2a-Isotyp-Kontroll-

Reagenz (FITC) # 349042 der Fa. Becton-Dickinson beigefügt. Nach Durchmischen der Ansätze bei niedriger Vortexumdrehung erfolgt die Inkubation für 30min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Lyse der Erythrozyten mit FACS Lysing und dreimaligem Waschen der Ansätze. Die Ansätze werden mit 2ml Diluent (0,01M PBS pH 7,4 mit 1% BSA und 0,1%NaN₃) durchmischt und für 10min bei 1400 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen der Überstände werden je 0,5ml 2%-Paraformaldehyd-PBS als Fixierung zugegeben und die Proben bis zur Messung auf Eis unter Lichtschutz aufbewahrt.

Für die **Markierung der Blutzellen mit den Zielantikörpern** werden jeweils 100µL Probe eine Einheit Heparin zugegeben, sowie nach Durchmischung der Ansätze der Teilbestimmung CD11B/CD18 durch niedrigen Vortex 10µL CD 11B-Antikörper (Fa. Sigma, # R-3638) und 20µL Anti-CD18 (Anti-LFA-1beta) FITC # 347953 der Fa. Becton Dickinson. Analog erfolgt die Zugabe von 10µL CD11C der Fa. Coulter Immunotech (# 1760,PE-Markierung,IO-Test,Clone BU15) und 20µL Anti-CD62L (Anti-Leu-8)-FITC # 7443 der Fa. Becton Dickinson in den Ansatz CD11C/CD62L.

Inkubation der Ansätze nach sanftem Vortex bei Raumtemperatur unter Lichtschutz für 30min. Die Lyse der Erythrozyten erfolgt mit FACS Lysing Solution und es folgt dreimaliges Waschen des Ansatzes. Die Ansätze werden mit 2ml Diluent (0,01M PBS pH 7,4 mit 1% BSA und 0,1%NaN₃) durchmischt und für 10min bei 1400 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen der Überstände wird dem Pellett je 0,5ml 2%-Paraformaldehyd-PBS als Fixierung zugegeben und der Ansatz bis zur Messung auf Eis unter Lichtschutz aufbewahrt.

Die Messungen im Durchflußzytometer erfolgen somit als Doppelbestimmung, wobei die korrekte Kompensierung der Fluoreszenzen sorgfältig in Vorversuchen evaluiert wurde.

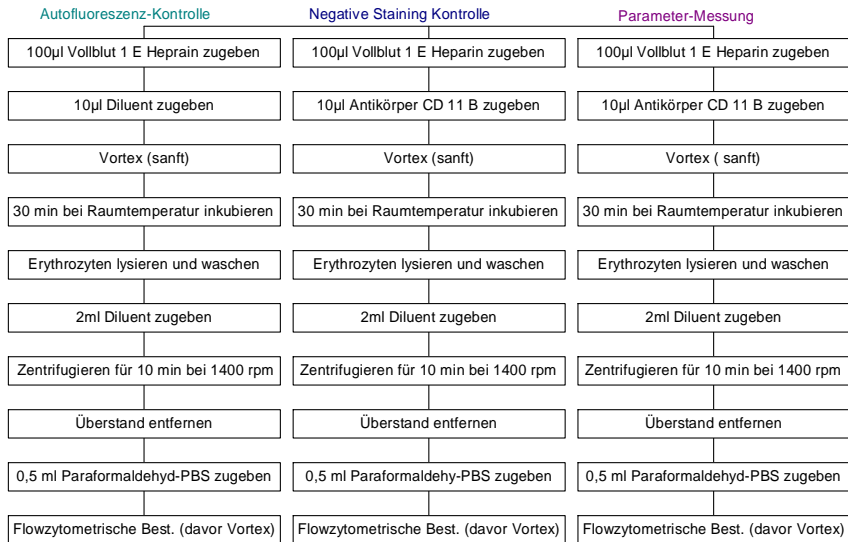


Abb. 2.14 : Method. Beispiel CD11B-Markierung

2.9.6 CellProbe

2.9.6.1 Beschreibung und Funktionsprinzip intrazellulärer Enzymdiagnostik

Die Messung von Enzymaktivität in lebenden Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie wird bereits seit einigen Jahren angewandt. 1969 wurde von Hulett et.al. die Hydrolyse von Fluorescein-Diazetat (FDA) durch intrazelluläre Esterasen beobachtet (28). 1976 folgten Studien von Kaplow et.al. über die Aktivität Esterasen in Monozyten (35).

In den folgenden Jahren wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und Marker an Substrate gebunden und verwandt, um die intrazelluläre Enzymaktivität zu untersuchen. Die meistuntersuchten Farbstoffe (Dyes) sind

Fluoreszenz-Marker	Merkmale
Rhodamin-110-Derivate	sehr niedrige Hintergrundfluoreszenz, die Fluoreszenz kann nur nach hydrolytischer Spaltung der Amid-Brücken und Freigabe des Rhodamin-110 gemessen werden

4-Methoxy-2-Naphtylamid	diffundiert zu schnell aus den Zellen heraus, wenn die Diffusion nicht durch 5-Nitrosalicylaldehyd unterbunden wird. Reaktion nur im sauren pH-Bereich möglich, daher kann der Farbstoff nur in lysosomalen oder anderen Zellorganellen mit saurem Milieu verwendet werden.
7-Amino-4-Trifluor-Methylocumarin (AFC)	geringe Sensitivität wegen zu starker Hintergrundfluoreszenz, die die Fluoreszenz der freien AFC-Gruppe überdecken kann

Abb. 2.15 : Eigenschaften der Fluorochrome der intrazellulären Bestimmungen

Es wurde deutlich, dass die Konjugation von Rhodamin-110 an Substrate ein 50-300-fach sensitiveres Fluoreszenzsignal abgibt, als die früher verwendete 7-Amino-4-Trifluor-Methylocumarin (AFC)- Verbindung.

Die Aktivität von Enzymen wird durch besondere Substrate ermöglicht, die synthetisch hergestellt und nicht fluoreszierend sind. Sie bestehen aus zwei abspaltbaren Gruppen, die an ein Farbstoffmolekül gebunden sind. Durch eine räumliche Anordnung verdecken diese Gruppen den Fluoreszenzfarbstoff, der somit im Ausgangssubstrat nicht von der Lichtquelle des Durchflußzytometers angeregt wird und auch keine Fluoreszenz emittieren kann. Werden die Bindungen zwischen den verdeckenden Gruppen und dem Farbstoff gespalten, wird der Fluoreszenzfarbstoff zur Anregung freigegeben. Bei dem eingebauten Farbstoff handelt es sich entweder um Fluorescein, durch Esterbrücken gebunden, oder um Rhodamin, durch Amidbrücken gebunden. Die Auswahl der verdeckenden Gruppen basiert auf der wissenschaftlich belegten Substratspezifität des jeweiligen Enzyms. Sie können etwa Peptide für proteolytische Enzyme, Zucker für Glykosidasen oder Azygruppen für Esterasen enthalten. Leytus et al. demonstrierten, dass die Peptidsequenz eines Substrates die Enzymspezifität verleiht.

1992 entdeckten Watson et.al., bei einer Messung eine signifikante, von der initialen Konzentration des markierten Substrats abhängige, Verzögerung beim Anstieg der MeanFluorescence im Bereich von Sekunden bis Minuten. Es lag nahe, dass eine gewisse Zeit für die Penetration der Zellwand und die Bindung an die Zielenzyme benötigt wurde (83). Der genaue Mechanismus, wie die Substrate die Zellmembran durchwandern ist nicht bekannt. Mögliche Wege sind die passive Diffusion durch die

Membran, sowie die aktive und passive Einschleusung durch Transportproteine der Zellmembran. Hinweise für das Vorhandensein eines spezifischen Zellmembran-assoziierten Transportmechanismus für Dipeptide und deren Derivate wurden beschrieben (76). Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern, die normalerweise eine feste und nur schwer lösbare Verbindung mit dem Zielepitop eingehen, binden die CellProbe™-Substrate nur für den Prozess der Enzymfunktion an das Zielepitop. Die, nach der Abspaltung des Farbstoffes auf dem Substratkomplex, freigesetzten Farbstoffe akkumulieren in der Zelle und erreichen innerhalb von Minuten ein Konzentrationsmaximum. Dies verdeutlicht, dass die Inkubationszeiten und die Abstände zwischen Markierung und Messung auf jeden Fall präzise eingehalten werden müssen, um eine objektive Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Versuchsreihen sicherzustellen.

Die MeanFluorescence stellt den wichtigsten Messwert in der Flow-Enzymologie dar und wird sowohl von der Konzentration des untersuchten Enzyms in der Zielzelle, als auch von dessen Aktivität beeinflusst. Die Ortständigkeit des Enzyms, z.B. im Zytoplasma oder in Zellorganellen (Elastase) bzw. Speicherung in Granula, hat ebenfalls einen Einfluß auf die erreichte Fluoreszenzmessung.

Die Kenntnis der Flow-Enzymologie hat insofern eine besondere Bedeutung, da sowohl Zellpopulationen durch ihr Enzymmuster eindeutig identifiziert werden können, als Defizienzen der Enzyme erkannt werden können. Da Enzyme in fast jedem Vorgang in der lebenden Zelle eine wichtige Rolle einnehmen, ist diese Erkennung für die Pathogenese von Erkrankungen relevant.

2.9.6.2 FR – Kallikrein – Beschreibung des Testgegenstands

Bei dem Kallikrein-Kinin-System handelt es sich um ein biochemisch u. energetisch bedeutsames physiologisches Regelsystem für die Freisetzung von Kininen, wobei durch die Kininogenase aus Kininogenen (= Kininvorstufen) Kinine gebildet werden., Darunter finden sich auch Kinine mit vasodilatatorischer u. natriuretischer Wirkung (so daß ein Antagonismus zum Kinin-Angiotensin-System vermutet wird).

Kallikreine sind proteolytische Enzyme, die für die Bildung des Kinins verantwortlich sind. Die Kallikreine entstehen bei Verletzung oder Entzündung sowie bei der Blutgerinnung aus Präkallikrein (Kallikreinogen = Fletcher* Faktor) über Präkallikrein-Aktivatoren. Kallikreine kommen mit insgesamt 5 Typen im Blutplasma (als

Serumkallikrein), in den Granulozyten, verschiedenen Drüsen sowie in Nieren, Pankreas u. Darm vor (Kallidin). Als Kallikrein-Inhibitoren können Eiweißkörper (Peptide) eingesetzt werden, die Kallikrein (sowie Trypsin) inaktivieren und in Pflanzen, Mikroben, Milch sowie im Blutserum u. in Organen des Menschen (als Faktor des Kallikrein-Kinin-Systems) vorkommen. Entsprechende Präparate wie Aprotinin aus Rinderlunge, -pankreas, -parotis finden Anwendung bei Zuständen mit Kininvermehrung (Schock, Karzinoid-Flush, Hyperfibrinolyse, Pankreatitis).

Faktor XII, Präkallikrein und hochmolekulares Kininogen sind gemeinsam an den Reaktionen nach Kontakt des Bluts mit einer Fremdoberfläche beteiligt. Außerdem wirkt Kallikrein mit einem positiven Feedback-Mechanismus auf die Aktivierung des Faktors XII. Während in der Zirkulation unter Normalbedingungen Faktor XII und Präkallikrein nur von untergeordneter Bedeutung für die Hämostase sind, steigt ihr Stellenwert nach Fremdoberflächenkontakt. Eine weitere Funktion übt Kallikrein über Plasminogenaktivierung eine profibrinolytische Funktion aus.

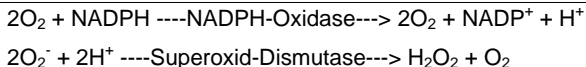
Als Substrat für das Plasmaenzym Kallikrein kommt Phenylalanin-Arginin-Rhodamin 110 zur Anwendung. Kallikrein wird im menschlichen Plasma nachgewiesen und wirkt als Protease im Ablauf der Gerinnung mit, indem es das hochmolekulare Glykoprotein Kininogen spaltet. Es entsteht unter anderem das Peptid Bradykinin. Die Produktion von Bradykinin hat mehrere physiologische Folgen für den Organismus, wie etwa die Kontraktion glatter Muskulatur (Kontraktion peripherer Gefäße während des Gerinnungsprozesses, sowie Dilatation der Kapazitätsgefäße), eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, oder die Aktivierung der Phospholipase A. Die Phenylalaninderivate wurden als spezifischere Substrate für das Plasmakallikrein nachgewiesen. Sie haben eine höhere Affinität zum humanen Plasmakallikrein, als für das Isoenzym Pankreas-Kallikrein und andere Proteasen der Gerinnungskaskade.

Das CellProbe™-FR-Kallikrein-Substrat wird von Kallikrein zur nicht fluoreszierenden, abgespaltenen Gruppe und zu Rhodamin 110 hydrolysiert. Rhodamin 110 kann aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften durchflußzytometrisch analysiert werden. Es wird bei 468-509nm angeregt und emittiert im Bereich von 504-541nm. Plasmakallikrein wird synonym als Kininogen oder EC 3.4.21.34 bezeichnet. Angewendet wird das CellProbe Reagenz 7547083 der Fa. Coulter, Krefeld, Deutschland.

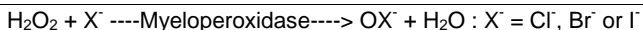
2.9.6.3 Oxidativer Burst – DCFH – PMA – – Beschreibung des Testgegenstands

Außer der Aktivität von einzelnen proteolytischen Enzymen, können durch Anwendung von fluorogenen Substraten auch komplexe, zelluläre Vorgänge erfasst werden. Die Konversion von nicht-fluoreszierendem Dichlorfluorescein-Diazetat (DCFH-DA) in die stark fluoreszierende Verbindung 2-7-Dichlorfluorescein (DCF) kann dazu verwendet werden, den oxidativen Burst in polymorphonuklearen Leukozyten zu beobachten *195*. Die Enzyme, die für die oxidative Burst-Reaktion verantwortlich sind, werden in stimulierten Neutrophilen äußerst schnell aktiviert (85). Der Substratansatz für die DCFH/PMA/Oxidativer Burst-Bestimmung enthält die Verbindung Phorbol-Myristat-Azetat (PMA), die ein Analogon zum zellulären Signalweg durch das Molekül Diacetyl-glycerol (DAG) darstellt (3). Aus diesem Grund stimuliert die Anwesenheit von PMA Prozesse, die natürlicherweise von DAG (Diacetyl-glycerol) initiiert werden. Hierzu gehört auch der Oxidative Burst.

Das Prinzip des Tests beruht auf folgender Überlegung: Während des oxidativen Bursts produzieren die zellulären Enzyme NADPH-Oxidase und Superoxid-Dismutase das Superoxid-Anion (O_2^-), sowie Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2) nach folgender Reaktionsgleichung



Falls Myeloperoxidase im Ansatz vorhanden ist, wird das Hydrogenperoxid gespalten



Die Umwandlung des nicht-fluoreszierenden Dichlorfluorescein-Diazetat (DCFH-DA) in die stark fluoreszierende Verbindung 2-7-Dichlorfluorescein (DCF) benötigt mehrere Reaktionsschritte. Zunächst wird DCFH-DA durch die Zellmembran hindurch transportiert und durch Esterasen zu nicht-fluoreszierenden 2-7-Dichlorfluorescein deazetyliert. Diese Verbindung kann das Innere der Zelle nicht verlassen. Im folgenden Schritt wird DCFH durch Peroxide (H_2O_2) zu DCF konvertiert. Diese Konversion wird durch die Anwesenheit von Peroxidase erheblich beschleunigt

DCFH-DA ---Esterase---> DCFH ---H ₂ O ₂ /Peroxidase---> DCF

Die Messung der Fluoreszenz von DCF entspricht damit der Produktion von H₂O₂ und der Anwesenheit von Peroxidase. Angewendet wird das CellProbe Reagenz 7547078 der Fa. Coulter, Krefeld, Deutschland.

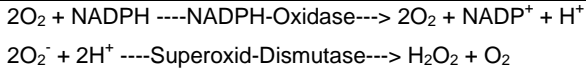
Klinisch wird der Test unstimuliert, FLMP- und mit Stimulation durch E.coli durchgeführt. Der Erwartungswert beträgt beim Spontanburst 0-5%, beim FLMP-induzierten Burst 0-20 und beim E.coli-induzierten Test 95-100% Anteil oxidierender Zellen. Der Test wird bei v.a. septische Granulomatose (CGD), NO-Intoxikation und Sepsis durchgeführt. Eine verminderte Burstaktivität wird auch bei AIDS- und Transplantationspatienten beobachtet. Ursprünglich wurde der Bursttest zur quantitativen Bestimmung der sauerstoffabhängigen, intrazellulären Inaktivierung von mikrobiellen Keimen in Granulozyten und Monozyten durchgeführt.

2.9.6.4 Peroxides / DCFH – Beschreibung des Testgestands

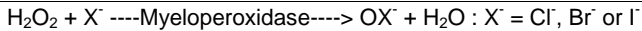
Peroxide sind vom Wasserstoffperoxid (H₂O₂) ableitbare Sauerstoff(O II)-Verbindungen der allg. Formel R²O₂ (R1 = einwertiges Element, v.a. Metall, oder Radikal; frühere Bezeichnung: "Superoxyde", im Falle organischer Verbindungen "Peroxi-Gruppe"). Sie sind starke Oxidanzien (beim Vermischen mit Glycerin, Äther, Eisessig, Stroh etc. explosiver Zerfall!).

Die Umwandlung von nicht-fluoreszierendem Dichlorfluorescein-Diazetat (DCFH-DA) in das stark fluoreszierende 2-7-Dichlorfluorescein (DCF) wird genutzt, um die Präsenz von Peroxiden im Reaktionsverlauf des Oxidativen Bursts in Leukozyten nachzuweisen. Ruhende Zellen ohne Stimulus beinhalten in der Regel keine Peroxide, wohingegen die Peroxidproduktion rasch nach Einwirken verschiedener Stimuli auf die Zelle in Gang kommt, so beispielsweise bei Einwirken von Bakterien und anderen körperfremden Organismen. Die Produktion von Peroxiden, in Abhängigkeit vom oxidativen Burst, kann durch die Zugabe des der Verbindung Phorbol-Myristat-Azetat in Neutrophilen künstlich angeregt werden. Der DCFH-Peroxidase-Ansatz wird unter anderem verwendet, um den Effekt anderer Verbindungen auf den Oxidativen Burst zu untersuchen, beispielsweise das chemotaktisch wirksame Peptid f-met-leu-phe (FLMP) oder das von Hefe produzierte

Zymosan. Während des oxidativen Bursts produzieren die zellulären Enzyme NADPH-Oxidase und Superoxid-Dismutase das Superoxid-Anion (O_2^-), sowie Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2) nach folgender Reaktionsgleichung



Falls Myeloperoxidase im Ansatz vorhanden ist, wird das Hydrogenperoxid gespalten



Die Umwandlung des nicht-fluoreszierenden Dichlorfluorescein-Diazetat (DCFH-DA) in die stark fluoreszierende Verbindung 2-7-Dichlorfluorescein (DCF) benötigt mehrere Reaktionsschritte. Zunächst wird DCFH-DA durch die Zellmembran hindurch transportiert und durch Esterasen zu nicht-fluoreszierenden 2-7-Dichlorfluorescein deazetyliert. Diese Verbindung kann das Innere der Zelle nicht verlassen. Im folgenden Schritt wird DCFH durch Peroxide (H_2O_2) zu DCF konvertiert. Diese Konversion wird durch die Anwesenheit von Peroxidase erheblich beschleunigt



Die Messung der Fluoreszenz von DCF entspricht damit einem Maß der Produktion von H_2O_2 und der Anwesenheit von Peroxidase.

Angewendet wird das CellProbe Reagenz 7547077 der Fa. Coulter, Krefeld, Deutschland.

2.9.6.5 AAPV – Elastase – Beschreibung des Testgegenstands

Derivate des Tetrapeptids ala-ala-pro-val wurden in der Literatur als Substrate für die eng verwandten Enzyme Leukozyten-Elastase (Neutrophilen-Elastase) und Pankreas-Elastase beschrieben. Elastasen definieren sich durch die Fähigkeit, Elastin zu spalten, ein Protein der Zellmatrix, das Geweben die Eigenschaft der Elastizität verleiht. Die menschliche Leukozyten-Elastase, eine **Serin-Protease** und

ein Hauptbestandteil der neutrophilen Granula, ist für die Phagozytose und die Abwehr gegen invasive Mikroorganismen von essentiellm Nutzen. Alternative Bezeichnungen für AAPV-Elastase sind EC 3.4.21.37 (Neutrophilen-Elastase) und EC 3.4.21.36 (Pankreas-Elastase). Angewendet wird das CellProbe Reagenz 7547070 der Fa. Coulter, Krefeld, Deutschland.

2.9.6.6 RGES – Elastase -- Beschreibung des Testgegenstands

Arg-gly-glu-ser-Rho110 ist Substrat der eng verwandten Enzyme Leukozyten- und Pankreaselastase. Das Tetrapeptid RGES ist Bestandteil der Sequenz von Fibronectin (20) , das von der menschlichen Leukozytenelastase gespalten wird (48). Beim Enzym Elastase handelt es sich um eine Serin-Protease, einem Hauptbestandteil der Leukozyten-Granula, die von enormer Wichtigkeit für Phagozytosevorgänge und die Abwehr gegenüber invasiven Mikroorganismen ist (9). Angewendet wird das CellProbe Reagenz 7547105 der Fa. Coulter, Krefeld, Deutschland.

2.9.7 CellProbe Methode

2.9.7.1 Vorbereitung der Proben – Herstellung einer Leukozytensuspension

Um eine Leukozytensuspension mit ausreichender Zellzahl herzustellen werden die Proben aus dem Chandler-Loop der Aktivierung im Loop zunächst mit einer Einheit Heparin/ml Vollblut vor weiteren Aktivierungen geschützt. Aus jedem Schlauchtyp und dem Leerwert werden je dreimal 500µL Vollblut in ein Falcon-Röhrchen (10ml Polypropylen-Röhrchen für Zentrifugation) überführt und 10ml PBS (pH 7.4-7.55) zugegeben. Nach kurzem Vortex werden die Proben für 10min bei 200G und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Einmal-Glaspipette abgesaugt ohne den Bodensatz aufzuwirbeln, das Sediment mit 10ml PBS resuspendiert und mit einer Transferpipette gemischt. Es folgt eine weitere Zentrifugation bei 500G für 5min bei Raumtemperatur. Der Überstand wird entfernt und das Sediment mit 10ml PBS resuspendiert. Mischung mit Transferpipette. Anschließend wird eine weitere Zentrifugation bei 500G für 5min und Raumtemperatur durchgeführt und der Überstand wieder durch Absaugen mit einer Einmalpipette entfernt. Unter Mischung mit einer Transferpipette wird den Ansatz 1ml

PBS zugegeben und die Leukozytenzahl mit dem Zell-Counter bestimmt. Es wird solange PBS zugegeben, bis die Zahl der weißen Blutzellen in der Zelllösung $3.0 \pm 0.5 \times 10^6$ Zellen/ml enthält, diese Dilution Ratio wird nach der ersten Zellzählung nach der Formel

$$\frac{\text{CellCountSample}(\mu\text{ml})}{3.0 \times 10^6 (\text{WBC}) \text{cells} / \text{ml}} = \text{Dilution Ratio}$$

bestimmt. Die drei angefertigten Ansätze pro Schlauchtyp, sowie der Leerwert, werden gegebenenfalls zusammengefügt und die Suspension neu eingestellt um eine ausreichende Substratmenge für die CellProbe-Markierungen zu erhalten, da die Aufbereitungsmethoden der Leukozytensuspensionen einen Volumen- und damit Zellverlust zur Folge haben. In der Regel betragen die Zellzahlen nach der Zusammenführung vor der Dilution 7400-7800 WBC/ μL .

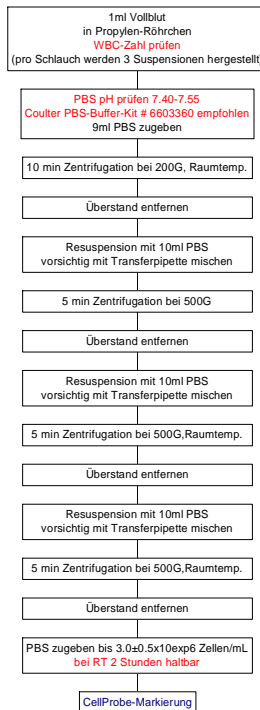


Abb. 2.16 : Flowchat CellProbe-Substratgewinnung

2.9.7.2 CellProbe - Vorbereitung der CellProbe™-Reagenzien

Die für je 10 Versuche aliquotiert gelieferten und bei 2-4°C gelagerten Reagenzien müssen vor Gebrauch rekonstituiert werden. Pro Vial (Reagenzienfläschchen) werden 250µL endotoxinfreies Typ II Wasser (aqua ad inj. / Pyrogen-freies Wasser) zugeben und die Lösung auf dem Vortex durchmischt. Bei 2-8°C beträgt die Verwendungsdauer max. 24 Stunden.

2.9.7.3 CellProbe - Markierung der Leukozyten (WBC)

Für jeden Versuch wird ein Proben-Set abgenommen und vorbereitet :

- Leerwert (blank), der nicht am Chandler-Loop-Durchlauf teilgenommen hat und sofort bearbeitet wird (L/B)
- Probe aus heparinbeschichtetem Schlauch zum Zeitpunkt t=60min (H1)
- Probe aus heparinbeschichtetem Schlauch zum Zeitpunkt t=120min (H2)
- Probe aus PVC-Schlauch zum Zeitpunkt t=60min (P1)
- Probe aus PVC-Schlauch zum Zeitpunkt t=120min (P2).

Für jede einzelne Enzymbestimmung wird ein neues, separates Proben-Set verwendet, zusätzlich wird je ein Set für die Qualitätskontrolle mit dem Kontrollreagenz CellCyme™ benötigt (Positivkontrolle).

Die folgende Methode wird immer parallel für jeden Ansatz durchgeführt. 50µL des gewaschenen und auf korrekte Zellzahl eingestellten Vollblutes werden in ein FACS-Röhrchen überführt und 10min im Wasserbad bei 37°C angewärmt. Nach Erreichen der Wasserbadtemperatur werden 25µL des CellProbe™-Reagenzes zugefügt und der Ansatz im Wasserbad durch 5-maliges Aufziehen mit der Messpipette gemischt. In den Leerwert wird anstelle des CellProbe™-Reagenz 25µL PBS einpipettiert. Die Inkubationszeit (siehe Tabelle) im Wasserbad wird exakt gestoppt und durch Überführen der Röhrchen in Eis für min.3min und max. 20min abgebrochen. Anschließend werden die Erythrozyten lysiert und die Probe bis zur durchflußzytometrischen Untersuchung auf Eis unter Lichtschutz gelagert.

Die Messung erfolgt innerhalb eines Zeitfensters von 30min ab Inkubation mit dem CellProbe™-Reagenz.

Bestimmung	Inkubationszeit
Oxidativer Burst – DCFH – PMA	5
Peroxidase – DCFH	5
FR – Kallikrein	10
AAPV – Elastase	10
RGES – Elastase	10

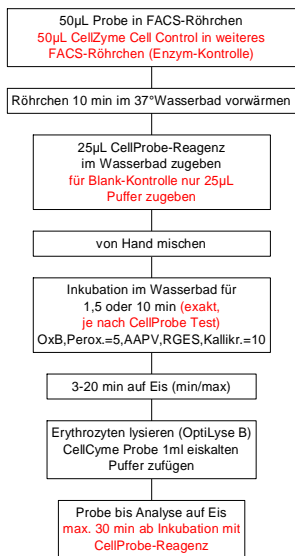


Abb. 2.17 : Markierung der Proben mit den CellProbe™-Reagenzien

2.9.7.4 CellProbe - Optionale Nachaktivierung der Proben vor Markierung mit CellProbe™-Reagenzien

Um bei zu geringen Unterschieden der Fluoreszenz die Enzymaktivität genauer zu untersuchen besteht die Möglichkeit zusätzlich zur, im folgenden als Voraktivierung bezeichneten Behandlung des Blutes im Chandler-Loop, eine Nachaktivierung nach Entnahme der Proben aus dem Loop vorzunehmen. Ziel ist eine, durch möglichst präzise Einhaltung der Methode gewährleistete, bei allen Proben gleichmäßige Verstärkung der durch die Voraktivierung induzierten Enzymaktivität zu erreichen.

Für die Nachaktivierung stehen PMA und FLMP zu Verfügung. Optional kann ein Ansatz zur Nachaktivierung auch bebrütet werden. Die Nachaktivierung durch Zugabe von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Propidium-Iodid (PI) steht ebenfalls als Möglichkeit zur Verfügung. Es sollte jeweils ein Ansatz mit einer Leukozytenkonzentration von mindestens 2×10^7 Zellen/ μL zur Verfügung stehen. Desweiteren ist die Anlage einer Kinetik-Studie, zumindest der Zeiträume 5, 10 und 15 min Inkubation, empfehlenswert.

2.9.7.5 CellProbe - Nachaktivierung mit PMA

Das Phorbol-12-mystrate-12-Azetat (PMA) der Fa. Sigma, Deutschland Produkt # P-8139 wird gemäß Verwendungsanleitung rekonstituiert, die 1mM Stammlösung in Cups aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Für jeden Versuch wird ein Alliquot durch Zugabe von 1ml HBSS rekonstituiert.

Die Vollblutproben aus den Chandler-Loop-Durchläufen (Leerwert / Heparin-Loop / PVC-Loop) werden zu je 0,5ml Vollblut in Falcon-Röhrchen gegeben und für 5min bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Es werden je $10\mu\text{L}$ PMA zugegeben und die Ansätze für 10min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation werden $0,5\text{ml}$ 4°C -PBS in weiteren Cups vorgelegt und die nachaktivierten Ansätze nach Ablauf der Inkubationszeit in die entsprechenden PBS-Cups überführt. Es folgt eine Zentrifugation in der Cup-Zentrifuge bei 6000rpm für 8min bei Raumtemperatur. Der Überstand wird ohne Aufwirbelung des Sediments mit je einer Einmal-Glaspipette abgesaugt und der Bodensatz in $400\mu\text{L}$ PBS (4°C) resuspendiert. Nach Messung im CellCounter mit einer Zielkonzentration von 2400-4500 WBC/ μL folgt die weitere Bearbeitung nach den jeweiligen CellProbe-Methoden bei einer Mindestzellzahl von 150.000 WBC im Ansatz.

2.9.7.6 CellProbe - Nachaktivierung mit FLMP

Bei FLMP handelt es sich um ein von Bakterien gebildetes Peptid, gegen das eine starke Abwehrreaktion seitens der Leukozyten bekannt ist. TNF- α kann ähnliche Funktionen der Leukozyten provozieren.

Aus N-formyl-L-methionin-L-leucyl-L-phenylalanin (FLMP, Molekulargewicht 437,6) der Fa. Sigma, Deutschland Produkt # F-3506 wird durch Rekonstitution in

Dimethylformamid der Fa. Aldrich, Deutschland, Produkt # 27,054-7 auf eine 1mM Lösung erstellt, die in Cups á 100µL aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt wird. Für jeden Versuch wird ein Aliquot durch Zugabe von 1ml HBSS rekonstituiert.

Die Vollblutproben der Chandler-Loop-Durchläufe (Leerwert / Heparin-Loop / PVC-Loop) werden zu je 0,5ml Vollblut in Falcon-Röhrchen gegeben und für 5min bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Es werden je 10µL FLMP zugegeben und die Ansätze für 10min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation werden 0,5ml 4°C-PBS in weiteren Cups vorgelegt und die nachaktivierten Ansätze nach Ablauf der Inkubationszeit in die entsprechenden PBS-Cups überführt. Nach Zentrifugation in der Cup-Zentrifuge bei 6000rpm für 8min bei Raumtemperatur wird der Überstand ohne Aufwirbelung des Sediments mit je einer Einmal-Glaspipette abgesaugt und der Bodensatz in 400µL PBS (4°C) resuspendiert. Nach Messung im CellCounter mit einer Zielkonzentration von 2400-4500 WBC/µL folgt die weitere Bearbeitung nach den jeweiligen CellProbe-Methoden bei einer Mindestzellzahl von 150.000 WBC im Ansatz.

2.9.7.7 CellProbe - Nachaktivierung des Vollbluts durch Bebrütung und Stimulatoren

Je 20µL der heparinisierten (1E Heparin\µL) Vollblutproben der Chandler-Loop-Durchläufe (Leerwert / Heparin-Loop / PVC-Loop) werden mit 180µL Kulturmedium RPMI 1640 gemischt und es werden jeweils 10µL der Stimulatoren PMA oder FLMP zugegeben. Es folgt eine Inkubation für 12 Stunden im Begasungsschrank bei 37°C und einer CO₂-Atmosphäre von 8%. Anschließend wird der Stimulator mit RPMI1640-Kulturmedium aus den Ansätzen durch Zentrifugation bei 6000rpm und Absaugen des Überstands ausgewaschen und die Ansätze nach Prüfung der Zielkonzentration an weißen Blutkörperchen nach den Cell-Probe™-Methoden bearbeitet.

2.9.7.8 CellProbe - Nachaktivierung des Vollbluts durch Bebrütung und Stimulatoren nach Herstellung einer Leukozytensuspension

Nach Herstellung einer Leukozytenrohsuspension durch Lyse der Erythrozyten gemäß der Lysemethode wird die Zelllösung durch zweimaliges Waschen mit

Kulturmedium RPMI1640 und Zentrifugation bei 6000rpm mit nachfolgendem Absaugen des Überstands durch Resuspendierung mit Kulturmedium RPMI1640 auf eine Zellkonzentration von 1.000.000 WBC/ml eingestellt. Die Ansätze werden nach Zugabe von 10µL PMA oder FLMP für 12 Stunden im Begasungsschrank bei 37°C und einer CO₂-Atmosphäre von 8% bebrütet. Die Stimulatoren werden durch Zentrifugation bei 6000rpm und Absaugen des Überstands ausgewaschen und die Ansätze nach Prüfung der Zielkonzentration an weißen Blutkörperchen nach den Cell-Probe™-Methoden bearbeitet.

2.9.7.9 CellProbe - Durchflußzytometrische Messung

2.9.7.9.1 CellProbe - Standardisierung des Durchflußzytometers - FlowCheck™

Bei Flowcheck™-Fluorospheres, Prod.Nr. 6605359, Coulter, Krefeld, Deutschland, handelt es sich um eine Suspension aus Polyesterol-Microspheres mit einem Durchmesser von 10 Microns in wässriger Lösung bei einer Konzentration von 1x10⁶ Fluorospheres/ml. FlowCheck™-Fluorospheres werden dazu verwendet, die optische Reinheit der Messeinheit und die Einstellungen der hydrodynamischen Fokussierung zu prüfen.

Die Geräteeinstellung für die FlowCheck™-Messung betragen : Forwardscatter 200 Volt bei 5.0 Gain, entsprechend einer totalen Verstärkung von 8.00. Sidewardscatter 897 Volt bei Gain 5.0 entsprechend totaler Verstärkung von 18.45. Der Detektor FL1 für grüne Fluoreszenz wird mit 737 Volt bei einem Gain von 1.0 entsprechend keiner Verstärkung einjustiert, der Detektor FL2 für rote Fluoreszenzen mit 636 Volt bei Gain 1.0. Mess-Stop bei 10.000 Zellen/Events. Die Fluoreszenzen werden gegeneinander kompensiert : $FL1 = FL1 - 0,9\% FL2$, sowie $FL2 = FL2 - 20\% FL1$. Protokollname Z0000926.PRO. Das Durchflußzytometer wird vor jeder Versuchsmessung mittels FlowSet™-Fluorespheres (Produkt # 6607007 Fa. Coulter-Immuntotech,Krefeld,D.) kalibriert. Es werden drei Standart-Protokolle für das Durchflußzytometer etabliert (Low, Medium und High), die für die tägliche Standardisierung verwendet werden.

2.9.7.9.2 CellProbe - FlowSet™-Fluorespheres

FlowSet™-Fluorospheres, Prod.Nr. PN6607007, Coulter, Krefeld, Deutschland, sind eine Suspension aus Fluorospheres, entsprechend fluoreszierenden Microbeads,

und werden für die Kalibrierung der Volt-Einstellung der Fluoreszenz bei der täglichen Routine vor der eigentlichen quantitativen Messung von humanen Leukozyten angewandt. Ebenso lässt sich die hydrodynamische Fokussierung und der Licht-Scatter optimal einstellen. Die Microbeads haben eine definierte Größe und enthalten je einen Farbstoff, der bei einer Anregung von 488nm eine Fluoreszenz im Wellenbereich von 525-700nm emittiert.

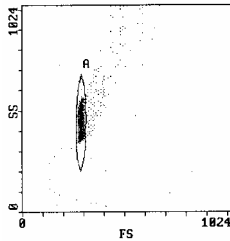


Abb. 2.18 : Blank-Fluoreszenz entsprechend der Autofluoreszenz

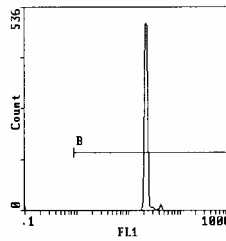


Abb. 2.19 : FlowSet™-Fluorespheres Fluoreszenz-Signal zur Kalibrierung des Standards, FL1 entspricht FITC

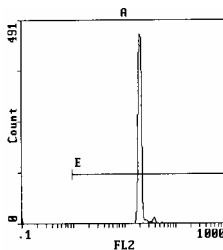


Abb. 2.20 : :FL2 entspricht RE/roter Fluoreszenz

Die Probe mit FlowSet™-Fluorespheres wird gemessen und der Forward- und Sideward-Scatter (Volt/Gain) eingestellt bis eine schmale Kurve entsteht. Die PMT (Volteinstellung für die Fluoreszenz) wird in den Zielbereich der benötigten MeanFluorescence gebracht und für alle Messungen beibehalten bzw. angepasst.

PMT Protokoll	Standart	Zielbereich MeanFluorescence	Volteinstellung	gemessener Wert

High	22.7 ± 0.3	717	22.8
Medium	5.82 ± 0.2	808	5.83
Low	2.46 ± 0.1	717	2.46

Die eigentlichen Enzymbestimmungen werden jeweils im entsprechenden Protokoll High, Low oder Medium gemessen.

Enzym	Mean Fluorescence	Channel	PMT Standard
Oxidativer Burst – DCFH – PMA	7.91	6.16-9.66	High
Peroxidase– DCFH	7.85	5.87-9.83	High
FR – Kallikrein	14.6	10.3-18.9	High
AAPV – Elastase	5.25	3.7-6.80	High
RGES – Elastase	7.55	3.47-11.6	High

2.9.7.9.3 CellProbe - Messung

Zunächst erfolgt die Messung des Leerwertes /Blank um den Forward- und Sideward-Scatter erneut zu justieren. Die Leukozytenpopulationen werden entsprechend ihrer Morphologie in Gates erfasst. Die Blank-Probe stellt sicher, dass die Backgroundfluoreszenz in jedem Fall niedriger ist, als die positive Fluoreszenz der enzymmarkierten Proben. Es folgt die Messung der enzymmarkierten Proben, wobei die MeanFluorescence der interessierende Wert ist und im Fall eines zweigipfligen Histogramms geprüft werden muss, ob eine Populationsüberscheidung der gesetzten Gates vorliegt. Der Messvorgang erfolgt mit der Durchflussrate LOW und endet bei 20.000 detektierten Zellen. Als Diskriminator ist der ForwardScatter mit einem Wert von 90 eingestellt. Das Listmode Gating ist deaktiviert.

2.9.8 Interleukine

2.9.8.1 Interleukine - Testbeschreibung und Funktionsprinzip

Zytokine stellen eine Gruppe von Mediatoren bzw. regulatorischen Eiweißen auf Proteinbasis dar, die in entscheidende Steuerungsvorgänge der Zelle im Rahmen ihrer Entwicklung, Funktion, Interaktion und Ablaufkontrolle eingreifen können. Der Begriff leitet sich aus dem Griechischen ab und (Zyto / Kinese) und bedeutet etwa „sich zwischen den Zellen bewegend“. Sie werden von der Zelle innerhalb kürzester Zeit nach Aktivierung oder nach Einwirkung spezifischer und unspezifischer im Rahmen von Immunreaktionen, pathologischer oder entzündlicher Reize gebildet, aber auch im Rahmen von Zelltod, Gewebereparatur und Kontraktilität von Herz und Gefäßen. Da Zytokine hormonähnliche Wirkungen entfalten wurden sie historisch gesehen zunächst anhand ihrer biologischen Wirkung beschrieben und klassifiziert. Aus dieser Funktionsbeschreibung leitet sich die herkömmliche Einteilung nach

- Interferonen (IFN)
- Interleukinen (IL1-IL23)
- Tumornekrosefaktor (TNF)
- Kolonie-stimulierenden-Faktoren (CSF)
- Wachstumsfaktoren (EGF, FGF, PDGF)
- transformierenden Faktoren (TGF)
- Chemokinen und
- Virokinen

ab. Gemeinsame Merkmale der Zytokine sind ihre biologische Wirksamkeit in kleinster Konzentration (picomolarer Bereich) und das weite Ausmaß der von ihnen aktivierten Steuerungs-/Stoffwechselfvorgänge auch im Sinne einer ausgeprägten Pleiotrophie. Die meisten Zytokine werden, nach Auslösung durch einen Aktivator, in prämaturer, nicht-sekretierbarer Form als Precursor mit einer N-terminalem hydrophoben Aminosäure-Abschlußfrequenz synthetisiert, die als Signalpeptid in den transmembranären Transport eingebunden ist. Die reife Form (mature) entsteht durch Abspaltung des Signalpeptids vom Precursor-Protein in die aktive Polypeptidform. Die Molekulargewichte der Zytokine reichen von 15.000 – 25.000 Dalton. Einige Zytokine sind nicht-kovalent mit der Zellmembran verbunden (Interleukin-1, TNF). Durch ihre erhöhte Nachweisbarkeit in Lymphozyten wurden sie synonym auch als Lymphokine benannt. Dort wurde ihre Funktion im Verlauf der T-Zell-vermittelten zytotoxischen Immunreaktion, sowie bei der B-Zell-Aktivierung nachgewiesen. Die Fähigkeit der Zytokine die Zellabläufe wie Differenzierung und Wachstum zu beeinflussen sind explizit an das Vorhandensein spezifischer

Rezeptoren gebunden. Diese Rezeptoren sind oberflächenständig und setzen das Rezeptorsignal nach Bindung in einen intra-zytoplasmatischen Signalweg um.

Zytokin → Rezeptor → Intrazell.Signalkaskade → Zellkern → Genaktivierung →
Biologische Funktion

Zytokinfreisetzung wird mit dem Auftreten des Post-Perfusions-Syndroms bzw. der systemischen inflammatorischen Reaktion (SIRS) in Verbindung gebracht. Unter anderem triggert ein hypoxischer Zustand Endothelzellen, Makrophagen und zirkulierende Monozyten zur Freisetzung von Zytokinen und sauerstoffabgeleiteten freien Radikalen.

Zytokine wurden bisher im Bioassay oder Immunoassay bestimmt. Bioassays korrelieren hierbei mit der biologischen Aktivität, Immunoassays dagegen quantifizieren die Proteinmasse oder Molarität der gesuchten Antigene im Ansatz. Durch den Einsatz der monoklonalen, Fluorochrom-markierten Antikörper gegen Zytokine oder ihre Rezeptoren sind genauere Studien in vitro möglich. Durch die teilweise im Zytoplasma gelegene Ortständigkeit ergibt sich leider auch die Notwendigkeit, die monoklonalen Antikörper durch spezielle Techniken ins innere der Zelle einzuschleusen, ohne die Oberflächenmorphologie der Zelle zu zerstören. Zum Einsatz kommt hier die IntraPrep™-Methode, die ebenfalls bei der Bestimmung der Hitze-Schock-Proteine angewandt wird (siehe dort).

Die Untersuchung der Aktivierung von Zytokinen im Rahmen der Biokompatibilität von Kunststoffoberflächen ist ein neuer Untersuchungsansatz. Gemessen wird hierbei das Ausmaß der Aktivierung in quantifizierbarer Form. Durch die äußerst geringe Konzentration der Zytokine kann es unter Umständen erforderlich werden, die durch den Oberflächenkontakt der Zellen induzierte Zytokin-Aktivität bzw. -Quantität durch lineare Nachaktivierung zu erhöhen. Hierfür wurden verschiedene Modelle und Methoden untersucht.

2.9.8.2 Interleukin-1 β - Beschreibung

Interleukin-1 wird von Zellen des Monozyten-/Makrophagensystems gebildet und stellt eine der vielseitigsten Mediatorsubstanzen des Immunsystems dar. Es handelt sich um ein Peptid mit einem Molekulargewicht von 17.000 Dalton und kommt in zwei

Formen mit identischer Funktion vor : Interleukin-1 α und Interleukin-1 β . Das Interleukin wirkt über die einen Rezeptor auf die Zielzellen ein und bewirkt z.B. die Proliferation oder Stimulation der Proteinbiosynthese. Synonym wird es als LAF (lymphocyte-activation-factor) bezeichnet. Der Referenzbereich liegt unter 4pg/ml EDTA-Plasma und wird klinisch mit erhöhten Werten bei akuten lymphatischen Leukämien, beginnender Transplantatabstoßung, rheumatoiden Arthritis und Sepsis beobachtet.

Der verwendete monoklonale Maus-Antikörper Anti-human-Interleukin-1 β der Fa. Diaclone, Besancon, Frankreich, Nr. B-A15 IL-1 β FI, Clone B-A15 ist für die Durchflußzytometrie FITC-markiert gehört der Immunklasse IgG1 an. Er wird auf unspezifische Bindung mit Mouse-IgG1-FITC der Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland, Nr. 349041, kontrolliert.

2.9.8.3 Interleukin 2 - Beschreibung

IL-2 wird von aktivierten T-Zellen gebildet und hat ein Molekulargewicht von 15.400 Dalton. Es dient unter anderem als T-Zell-Wachstumsfaktor (Synonym TCGF – T-Cell-Growth-Factor) und stimuliert die Produktion anderer Lymphokine (Interferone). Es induziert die Zytotoxizität aktivierter Makrophagen und steigert die Proliferation der B-Zellen. Synonyme Bezeichnung für IL-2 ist LMF (lymphocyte mitogenic factor). IL-2 zeigt signifikante anti-tumöröse Aktivität gegen versch. Tumorzellen über die Proliferation und klonale Vermehrung von T-Zellen gegen Karzinomzellen. Hierbei wird IL-2 therapeutisch bei therapierefraktären Tumoren eingesetzt (30% Langzeit-Remission beim metastasierten Nierenzell-Ca). Der Referenzbereich im EDTA-Plasma liegt unter 31,2 pg/ml.

Der verwendete Mouse-anti-human-IL2-Antikörper Nr. 855.021.010 Clone B-G5 der Fa. Biotest, Dreieich, Deutschland gehört zur Klasse IgG1 und ist für die Durchflußzytometrie FITC-markiert. Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper. Die Kontrolle auf unspezifische Bindung erfolgt analog zu IL1-beta.

2.9.8.4 Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α) - Beschreibung

In der Klassifikation der Zytokine wird der TNF den Interferonen zugeordnet. In weitere Klassen unterteilt werden Typ-I-Interferone (TNF- α , TNF- β („Lymphotoxin-

α /LT- α) , TNF- τ , TNF- ω) und Typ-II-Interferone (TNF- γ). TNF- α wird wiederum in Subklassen eingeteilt. Typ-I-Interferone werden auch als antivirale Zytokine und Typ-II-Interferone als immunregulatorische Zytokine mit antiviraler Aktivität angesehen. Neben der antiviralen Aktivität, u.a. durch Aktivierung NK-Zellen, wird den Interferonen antiproliferative Aktivität zugeschrieben. Bei TNF handelt es sich um einen von Zellen des Makrophagen-/Monozytensystems gebildeten oder gentechnologisch herstellbaren Faktor, der selektiv zur Auflösung maligner Zellen führen kann.

TNF- α ist der Prototyp der Zytokinfamilie. Dieser TNF wurde wahrscheinlich bereits im 19.Jahrhundert beobachtet, als festgestellt wurde, dass nach BCG- und LPS- (Lipopolysaccharid, Endotoxin) – Behandlung eine Aktivität an das Serum abgegeben wurde, die eine Nekrose von Tumoren verursachte.

Die empfindlichste Methode TNF- α im Plasma zirkulierend nachzuweisen basiert auf der extrem hohen Bindungsaffinität und –spezifität des p55-TNF-Rezeptors. Bei gesunden Probanden konnte mit dieser Methode kein TNF im Plasma nachgewiesen werden – die Nachweisgrenze des Assay liegt bei 200 attomol (10^{-18} mol/l), was 120.000 TNF-Trimeren oder 10 Femtogramm in 1ml Plasma entspricht ! Im Gegensatz werden bei akuten Erkrankungen wie dem septischen Schock TNF-Konzentrationen im Plasma im nanomolaren Bereich (10^{-9}) gemessen. Ob der Oberflächenkontakt zwischen in der Herz-Thorax-Gefäßchirurgie relevanten Kunststoffen und weißen Blutbestandteilen zu einem messbaren Anstieg der TNF-Konzentration führt, wird hier untersucht.

Die Freisetzung von TNF- α aus Makrophagen wird durch freigesetztes Endotoxin stimuliert. TNF- α steigt bereits kurz nach Einsetzen der EKZ an und die Spiegelverhältnisse stehen im Verhältnis zur Dauer der Ischämiezeit, wobei Myokard als bedeutendster Ursprungsort angesehen wird. Erhöhte TNF- α -Werte werden außerdem klinisch bei Meningokokkeninfektionen, parasitären Infektionen, septischem Schock und zerebraler Malaria beobachtet. Der Referenzwert liegt bei ELISA-Ansätzen unter 2,3 fmol/ml EDTA-Plasma.

Der Antikörper mouse-monoklonal-anti-human TNF- α , Nr. 855.161.010, Clone B-D9, der Fa. Biotest, Dreieich, Deutschland, ist für die Durchflußzytometrie FITC-markiert.

2.9.8.5 Interleukine – gemeinsame Methode IL-1 β ,IL-2,TNF- α

Für die optionale Oberflächenmarkierung zur eindeutigen Identifizierung der Zellen werden je 50µL oder 5×10^5 WBC aus den ChandlerLoops nach den definierten Rotationsdauern entnommen und durch Zugabe von 1E Heparin pro µL vor weiterer Aktivität blockiert. Nach Zugabe von 20µL Oberflächen-AK Simultest LeukoGATE CD45/14 der Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland, Produkt # 340040, wird der Ansatz nach Durchmischen mit einer Transferpipette für 15min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Ein weiterer Ansatz wird mit 20µL der entsprechenden Isotypkontrolle ebenfalls für 15min inkubiert. Anschließend wird der Ansatz lysiert, dreimal gewaschen und durch Zugabe von 0,5ml 2%-Paraformaldehyd fixiert. Die Lagerung bis zur durchflußzytometrischen Messung erfolgt auf Eis unter Lichtschutz.

Für die Interleukin-Markierungen werden den Loops und dem Leerwert jeweils Blut in EDTA-Medium entnommen und hiervon 50µL EDTA-Vollblut, respektive mindestens 5×10^5 WBC pro Ansatz, nach Zugabe von 100µL IntraPrep™-Reagent 1 und kurzem Vortex bei niedriger Rotation für 15min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Anschließend werden 4ml 4°C kaltes PBS zugegeben und der Ansatz für 5min bei 300G und Raumtemperatur zentrifugiert. Mit einer Einmalglaspipette wird der Überstand abgesaugt ohne das Sediment aufzuwirbeln und das Pellett mit 100µL IntraPrep™-Reagent 2 nach Durchmischung mit einer Transferpipette (kein Vortex) für 5min unter Lichtschutz bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wird die Zellsuspension mit einer Glaspipette durch dreimaliges Aufziehen vorsichtig von Hand durchmischt und 20µL Interleukin-Antikörper zugegeben. Der Ansatz der Isotypkontrolle erhält 20µL Isotyp-IgG der gleichen Produkt- bzw. Immunglobulin-Linie. Den Autofluoreszenzkontrollen werden lediglich 20µL PBS zugegeben. Es folgt nach sanftem Vortex die Inkubation bei Raumtemperatur für 15min unter Lichtschutz. Den Ansätzen werden 4ml 4°C kaltes PBS zugesetzt und eine Zentrifugation bei 300G und Raumtemperatur für 5min wird angeschlossen. Der Überstand wird ohne Aufwirbelung des Sediments mittels Glaspipette entfernt und der Bodensatz durch Zugabe von 500µL 0,5%-Paraformaldehyd-PBS resuspendiert und fixiert. Die durchflußzytometrische Analyse ist innerhalb von 2 Stunden bei Lagerung der Probe auf Eis (2-8°C) möglich.

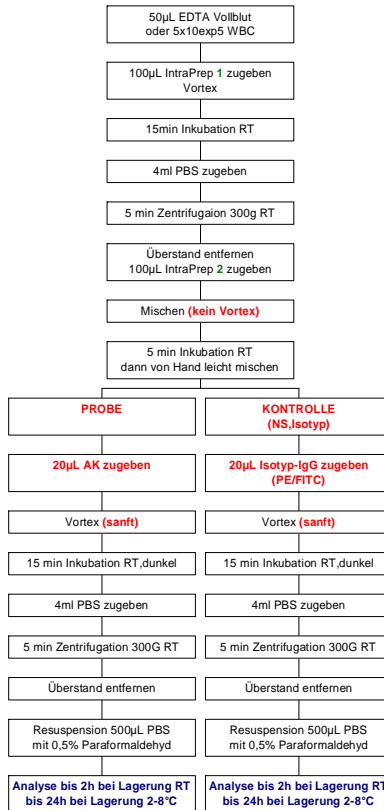


Abb. 2.21 : Interleukin-Markierung

2.9.8.6 Interleukine - Durchflußzytometrische Messung

Für die Messung im Durchflußzytometer werden Forward- und Sidewardscatter eingestellt, um eine optimale Darstellung der Populationswolken zu erhalten. Der Debris wird gegebenenfalls in den Bereich des Koordinatenursprungs abgedrängt.

10.000 Zellen wurden erfasst bei einem ForwardScatter von 250V mit Gain 2,0 , Sideward-Scatter 450V mit Gain 10, FL1 (FITC) 736V mit Gain 1 und FL2(PE) 717V mit Gain 1. Standartkompensierung der Fluoreszenzen und Auflösung 1024x1024. Protokollname Interleukine.pro Z0033213. Die Geräteeinstellungen wurden für die gesamte Messreihe und alle Interleukinbestimmungen beibehalten.

2.9.9 HeatShock

2.9.9.1 HeatShock – Hintergrund & Testbeschreibung

Veränderungen im Umfeld der Zelle, Verletzung, Krankheit, wie auch Wachstum und Differenzierung setzen Organismen in einen Stresszustand. Um diesem Umstand entgegenzuwirken haben die Organismen des menschlichen Körpers verschiedene Arten der „zellulären Stressantwort“ entwickelt. Dieser Abwehrmechanismus wird aktiviert, wenn Organismen mit Veränderungen in ihrem Mikrokosmos, respektive ihrer direkten Umgebung, konfrontiert werden. Der Hitzeschock auf den Organismus (HeatShock) ist herbei der am besten untersuchte Auslöser, die Stressantwort kann aber ebenso von einer Unzahl anderer Umstände oder Einflüsse ausgelöst werden. Wenn sich Stressproteine sich nicht gerade in einem Zustand der Abwehr gegenüber einwirkenden, schädlichen Einflüssen befinden, erfüllen sie Aufgaben in der Aufrechterhaltung der Homöostase der Zelle. Als Beispiel können Stressproteine angeführt werden, die als eine Art molekulare Aufsicht im Aufbau befindlichen Polypeptiden bei ihrer korrekten Peptidkonfiguration dienen. Weitere Aufgaben, die Stressproteine in „Ruhezeiten“ ausführen bestehen in der inter- und intrazellulären Signalvermittlung, Antigenpräsentation, der Rezeptorbindung im Kernbereich der Zelle und dem programmierten Zelltod (Apoptose). Stressproteine werden in einer Reihe von Krankheitsprozessen als Mediatoren aktiv, hierzu zählen

- Ischämiezustände (Schlaganfall)
- kardiovaskulären Erkrankungen (KHK)
- Tumoren
- Entzündungsreaktionen
- Trauma
- Alterungsprozesse
- Autoimmunvorgänge
- Zystische Fibrose
- Diabetes
- Schwerhörigkeit
- Infektionen sowie die
- Muskeldystrophie.

2.9.9.2 HeatShock - Eigenschaften des HSP70-Antigens

Das HeatShockProtein 70 (HSP70) gehört zur Familie der HSP70-Proteine, einer Gemeinschaft verschiedener Eiweiße, die bei Einwirkung von Stress, inklusive dem Hitze-Stress, in bisher jedem untersuchten Teil des menschlichen Mikrokosmos nachweisbar sind. Diese HSP-Familie besteht aus HSP70, einem Protein, das in vielen bekannten Organismen nachweisbar ist, anlagebedingt jedoch vor allem in Primaten, einschließlich dem Menschen, gefunden wird. Weitere Proteine sind HSP72, ein 72kDalton großes Protein, das ausschließlich unter Stresseinwirkung induziert wird, sowie HSC70 (synonym als Cognate Protein – HeatShock-verwandtes Protein bekannt), einem 72kDalton-Protein, das in das Uncoating von Clathrin-eingehüllten Vesikeln eingebunden ist und im Zytosol und zellkern-nah angetroffen wird. Weiterhin gehören GRP78 (Synonym BiP) , das, als 78kDalton großes Protein und vom Glucosespiegel reguliert, im endoplasmatischen Retikulum ortsständig ist, und p75 (Synonym HSP75), ein 75kDalton-Protein des mitochondrialen Milieus zur HeatShock-Familie.

2.9.9.3 HeatShock - Eigenschaften des HSP70-Antikörpers

Der verwendete HSP70-Antikörper der Fa. Affinity Bioreagents, Inc. Golden, CO, USA mit der Produkt# MA3-006 Clone 3a3 ist genetisch der Spezies Mouse und der Immunglobulinklasse IgG1 zugeordnet. Der Clone erkennt mehrere Epitope der HeatShock-HeLa-Protein-Reihe : HSP70, HSC70, p75 sowie nach Einwirken eines HeatShock auch HSP72. Durch gezielte Mutationen und Deletionen des Antikörpers wurde als Bindungsort die Stelle zwischen den Aminosäuren 504 und 617 des humanen HSP70 entdeckt. Clone 3a3 ist nicht ausschließlich spezifisch für das menschliche Epitop, er reagiert ebenso mit Hefe-, Fisch- und Affenepitopen.

Der Antikörper wird durch Hybridisierung des Produkts der Fusion von SP2/0 Myelomzellen und Splenozyten BALB/c-positiver Mäuse hergestellt, die vor der Fusion mit rekombinanten menschlichen HSP70-Proteinen in E-coli-Bakterien immunisiert wurden. Für die Immunfluoreszenz wird eine Arbeitskonzentration von 1:100 der Stammlösung angestrebt.

2.9.9.4 Einschleusung der HeatShock-Antikörper in die Zellen

Bei der Untersuchung intrazellulärer Strukturen können wertvolle Daten erhoben werden. Beispiel sind die intrazelluläre Signaltransduktion, die intrazelluläre Proteinstudien und die Erfassung von Stoffwechselfvorgängen innerhalb der Zelle. Antikörper sind normalerweise nicht membrangängig.

IntraPrep™ der Fa.Coulter-Immunotech, Krefeld, Deutschland ist ein Reagenzien-Set, das es Antikörpern mit intrazellulärem Ziel ermöglicht, die Zellmembran zu durchdringen mit dem Ergebnis nukleärer und zytoplasmatischer Immunphänotypisierung innerhalb menschlicher weißer Blutzellen.

IntraPrep™ beruht auf dem Prinzip der chemischen Durchlöcherung der Zellmembran, ohne die Morphologie der Zellmembran zu zerstören – dies ist für die Erhaltung der durchflußzytometrisch gemessenen Oberflächendaten der Zelle zur Typisierung mittels Forward- und Sidewardscatter unerlässlich. Es besteht damit die Möglichkeit einer gleichzeitigen intrazellulären und oberflächenständigen Markierung. Oberflächenmarkierungen müssen jedoch in der Vorbereitungsphase vor der Permeabilisierung der Zellen stattfinden.

IntraPrep™ besteht aus zwei Reagenzien. Reagent 1 fixiert die Zellen und nachfolgend werden durch Reagent 2 die Membranlöcher für den Antikörperdurchtritt, sowie gleichzeitig eine Lyse der Erythrozyten im Ansatz erstellt. Die IntraPrep™-Reagents werden bei Raumtemperatur unter Lichtschutz gelagert.

2.9.9.5 Markierung des HSP70-Antikörpers mit PE-Sekundärantikörper

Um den HeatShock 70 (HSP70)-Antikörper in der durchflußzytometrischen Messung sichtbar zu machen wird er mit einem Sekundärantikörper der Fa. Coulter-Immunotech, Krefeld, Deutschland markiert. Es handelt sich um den R-Phycoerythrin-konjugierten (PE) AffiniPure F(ab')₂-Antikörper, Produkt # 0551. Immunologisch entstammt er der Spezies Goat und ist gegen die Spezies Mouse gerichtet, er gehört zur IgG-Klasse. Seine Spezifität weist ihn als relativ unsensitiv für Bindungen mit menschlichen, rinds- und Pferdeproteinen aus. Die PE-Markierung wird von Laserlicht bei 490, 545 und 565nm angeregt, er emittiert bei einer Wellenlänge von 580nm im rot-orangen Bereich. Der Sekundärantikörper wird gefriergetrocknet geliefert und nach Erreichen der Raumtemperatur durch Zugabe

von 1ml destilliertem Wasser rekonstituiert. Die Lagerung erfolgt unter Lichtschutz bei 2-4°C für einen maximalen Zeitraum von sechs Monaten.

Eine Arbeitskonzentration von 1:50 bis 1:200 (1:100) wird vor jedem Versuch durch Zugabe von Aqua ad inj. hergestellt. Nach Herstellen der Arbeitslösung ist diese für 24h bei Lagerung analog der Stammlösung verwendbar

2.9.9.6 HeatShock - Methode

Der à 2ml aliquotierte HeatShock70-Antikörper wird durch Zugabe von 198µl Aqua ad inj. auf eine Arbeitskonzentration von 1:100 gegenüber der Stammlösung verdünnt. Für jeden Ansatz wird ein Aliquot bereitgestellt (200µL AK im Ansatz). Weiterhin wird der Sekundärantikörper auf eine Arbeitskonzentration von 1:100 eingestellt. Aus dem Chandler-Loop werden je eine Monovette EDTA-Blut gemäß folgendem Schema entnommen :

- Leerwert / Blankprobe
- PVC-Loop zum Zeitpunkt 2h
- PVC-Loop zum Zeitpunkt 4h.
- Heparin-Loop zum Zeitpunkt 2h
- Heparin-Loop zum Zeitpunkt 4h.

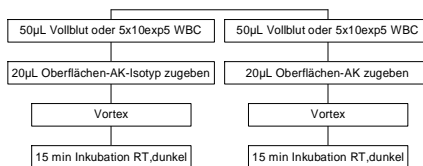
Es werden pro Ansatz 50µL EDTA-Vollblut, bzw. 5×10^5 WBC entnommen. Die Zellzahl wird im Zell-Counter geprüft. Jedem Ansatz werden 100µL IntraPrep™ Reagent 1 Nr. IM 2388 der Fa. Coulter, Krefeld, Deutschland, zugegeben und per Vortex bei niedriger Rotation 30sec gemischt. Es folgt die Inkubation für 15min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Anschließend werden 4ml 4°C kaltes PBS zugegeben und der Ansatz nach Durchmischung mit dem Vortex für 5min bei 300G zentrifugiert (RT). Mit einer Einmalglaspipette wird der Überstand abgesaugt, ohne den Bodensatz aufzuwirbeln. Das Sediment wird mit 100µL IntraPrep™ Reagent 2 (im Kit Nr. IM 2388 der Fa. Coulter, Krefeld, Deutschland enthalten) in Lösung gebracht und der Ansatz durch mehrmaliges Ausziehen in eine Einmalglaspipette durchmischt. Es folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5min unter Lichtschutz. Die Proben aus den Chandler-Loops werden mit 20µL HSP70-Antikörper versetzt und durch sanften Vortex durchmischt. Nach Ablauf der 15min Inkubation unter Lichtschutz bei Raumtemperatur wird 4ml 4°C-kaltes PBS zugegeben und die Probe für 5min bei 300G und Raumtemperatur zentrifugiert. Durch Absaugen mit einer

Glaspipette wird der Überstand entfernt. Es folgt die Sekundärmarkierung mit 50µL Anti-Mouse-F(ab')₂-PE-Antikörper Coulter-Immunotech # 0551 und eine nachfolgende Inkubation für 15min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Nach Zugabe von 4ml 4°C kaltem PBS folgt eine Zentrifugation bei RT für 5min bei 300G. Der Überstand wird abgesaugt und das Sediment mit 500µL 0,5%-Paraformaldehyd-PBS resuspendiert. Die Durchflußzytometrische Messung erfolgt innerhalb von 2 Stunden bei Lagerung auf Eis und ist theoretisch bis 24h nach Inkubation des Sekundärantikörpers bei Lagerung zwischen 2-8°C möglich.

Für die NegativeStaining-Kontrolle (Probe auf unspezifische Bindung) wird dem Ansatz 20µL Isotyp IgG der Spezifität des Primär- und des Sekundärantikörpers mit entsprechender PE-Markierung zugegeben und der Ansatz nach Vortex für 15min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4ml 4°C kaltem PBS folgt eine Zentrifugation bei RT für 5min bei 300G. Es folgt die Sekundärmarkierung. Die durchflußzytometrische Messung erfolgt innerhalb von 2 Stunden.

Weiterhin wird je Schlauchtyp eine Probe vorbereitet, die lediglich analog zur vorstehenden IntraPrep™-Methode mit den Reagents behandelt wird, aber keine Antikörpermarkierungen erhält (Autofluoreszenzkontrolle).

Optional kann eine Oberflächenmarkierung mit CD45/CD14 zur genauen morphologischen Beurteilung und Zuordnung der Zellpopulationen vorgenommen werden



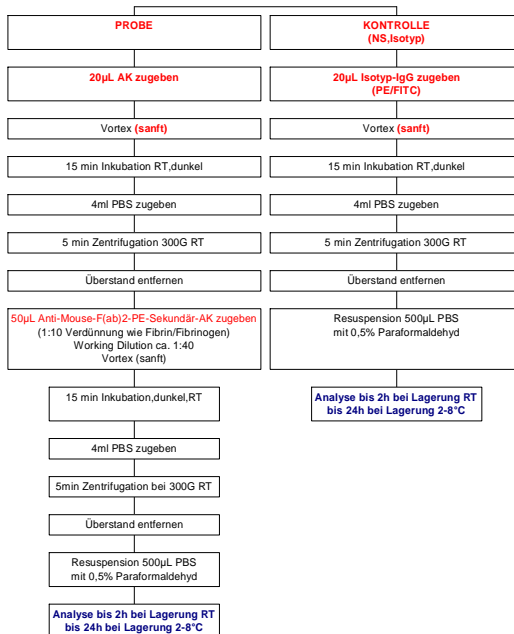
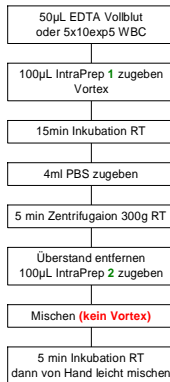


Abb. 2.22 : Flowchart der Methode für die Markierung der Zellen mit HSP 70 und Sekundärmarkierung mit PE-fluoreszierendem Sekundärantikörper für die durchflußzytometrische Messung

2.9.9.7 HeatShock – Geräteinstellung & Messung

Die Messung der Proben erfolgt mit dem Coulter EPICS XL/MCL-Durchflußzytometer. Bei einer mittleren (medium) Durchflussrate werden mit einem Forward-Scatter von 700Volt bei einem Gain von 2,0, entsprechend einer Gesamtverstärkung von 6,20, sowie einem Sideward-Scatter von 550Volt bei Gain 10,0, entsprechend einer Gesamtverstärkung von 26,50, die oberflächliche Morphologie der Zellen erfasst. Die interessierende rote Fluoreszenz des Sekundärantikörpers (PE = FL2) wird mit einer Volteinstellung von 620 bei 1,0 Gain gemessen. Der grüne Fluoreszenzkanal FL1 (FITC) wird auf 500Volt bei einem Gain von 1,0 eingestellt. Stopp der Messung bei 10.000 Zellen im Histogramm 1 in einem 128x128 großen Diagramm. Als Diskriminator ist der Forwardscatter mit einem Wert von 90 gesetzt, das Listmodegating ist deaktiviert. Die Fluoreszenzen werden gegeneinander kompensiert : $FL1 = FL1 - 0,9\%$ $FL2 = FL2 - 20\%$ $FL1$.

2.9.10 Thrombozyten

2.9.10.1 Bemerkungen zu Thrombozytenstudien

Die Thrombogenität einer Kunststoffoberfläche stellt eines der wichtigsten Kriterien zur Beurteilung der Biokompatibilität dar. Eine Freisetzung von thrombogenen Substanzen kann durch die Boostermechanismen der Signalwege eine massive Gerinnungsstörung im Sinne einer Hyperkoagulabilität mit den Folgen von thrombotischen Verschlüssen der makro- und mikroskopischen Gefäße veranlassen. Thrombozytenstudien stehen in der Biokompatibilitätsforschung aus diesem Grund mit in erster Reihe.

2.9.10.2 Verwendetes Substrat

Für Thrombozytenstudien kommen Plättchensuspensionen zur Anwendung, die mehr (Platelet-rich-plasma, PRP) oder weniger (einfache Plättchensuspension) rein von anderen Zellen sind. Vorteile der Entfernung anderer Zellreihen sind etwa die bessere durchflußzytometrische Erfassung der Zielpopulation. Zudem lassen sich Plättchenkonzentrate einfach herstellen und sehr präzise auf eine Zielkonzentration einstellen.

2.9.10.3 Methode - PRP

Für die Herstellung einer Plättchensuspension (Platelet-rich-plasma, PRP) werden 4,5ml Blut in Entnahmemedium (5ml Monovette, neutral mit 100U (entspr. 20U/ml) Heparin)abgenommen und in ein Stabilisatormedium umgefüllt (10ml Monovette neutral mit 5ml Formaldehyd 1% in PBS, pH 7,2). Das Stabilisatormedium wird einmal umgeschüttelt und 15min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Nach 10min Zentrifugation bei 100G Entnahme des Überstands mit Abstand zur Erythrozytenphase und Übergabe in weiteres Röhrchen. Es folgt eine weitere Zentrifugation für 10min, 100G und Raumtemp. Der nun abhebbare Überstand stellt PRP dar und wird weiter konzentriert. Er wird 5min bei 700G zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellett in 1,8ml Waschlösung (3,8% tri-NaCitrat in PBS,pH 7,2) und 200µL Rabbit-Serum bzw. weiteren 200µL Waschlösung resuspendiert und erneut bei 700G 5min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellett in 1ml Waschlösung resuspendiert. Die Suspension wird im Zell-Zählautomaten gemessen und auf eine Thrombozytenkonzentration von 50.000 Thr/µL eingestellt.

2.9.10.4 Methode – einfache Plättchensuspension

Die Vollblutprobe wird in einem Zitratröhrchen abgenommen, vermischt und 15min bei 150G zentrifugiert. Der Überstand stellt die Plättchensuspension dar, die abgehoben und in ein neues Röhrchen überführt wird. Die Suspension wird im Zell-Zählautomaten auf die Thrombozytenzahl gemessen und mit PBS auf 50.000 Thr./µl eingestellt.

2.9.10.5 CD 41-Markierung auf Thrombozyten

2.9.10.5.1 Beschreibung des Tests

Das CD41-Antigen ist ein transmembranäres Glykoprotein aus zwei Ketten - GPIIb α (120kD) und GPIIb β (23kD) – die untereinander durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. CD41 ist immer nicht-kovalent mit dem CD61-Antigen assoziiert (gemeinsam wird der GPIIbIIa-Komplex gebildet) und wird von Plättchen präsentiert. Es findet sich außerdem auf Megakaryozyten und einen Teil der CD34-positiven Zellen. Im Ruhezustand geht der Komplex Verbindungen mit immobilisiertem Fibrinogen ein

und in aktiviertem Zustand fungiert er als Rezeptor für lösliches Fibrinogen, Fibronectin, von-Willebrand-Faktor, Vitronectin und Thombospondin. Somit ist er zentral in die Plättchenfunktion Aggregation eingebunden. Im Falle der Erkrankung Glanzmann'sche Thrombasthenie konnte ein starker Mangel an CD 41 nachgewiesen werden. Die Markierung von Thrombozyten mit CD41 ermöglicht es eine genaue Identifizierung der Thrombozyten zur Qualitätskontrolle der Messungen, zum anderen lassen sich Bindungen von Thrombozyten an andere Zellen beobachten (z.B. „CD41 positive Granulozyten“).

Zu Anwendung kommt der CD41-Antikörper der Fa. Coulter, Krefeld, Deutschland, Nr. 1756 Clone SZ22, der FITC markiert ist. Die Markierung der Thrombozyten mit CD41 behindert nicht die Bindung von Fibrinogen an das gpIIb/IIIa-Epitop. Entsprechend seiner Isotypklasse wird ein Negative Staining mit Mouse-IgG1-FITC, Nr. 0639, Clone 679.1Mc7 des gleichen Hersteller durchgeführt. Der gefriergetrocknete AK wird mit 1ml Aqua dest. rekonstituiert und bei 2-8°C im Dunkel maximal 4 Wochen gelagert.

2.9.10.5.2 Methode

Je 100µl Plättchensuspension werden mit 25µL Anti-CD41-FITC nach Durchmischung mit einer Einmalpipette für 45min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 1ml Waschlösung (3,8% tri-NaCitrat in PBS, pH 7,2) wird der Ansatz 5min bei 700G zentrifugiert. Ein Milliliter Überstand werden abpipettiert und der Bodensatz mit 1ml Sheath-Fluid (Trägerlösung des Durchflußzytometers) resuspendiert. Die durchflußzytometrische Messung erfolgt innerhalb von 1 Stunde. Lagerung auf Eis unter Lichtschutz.

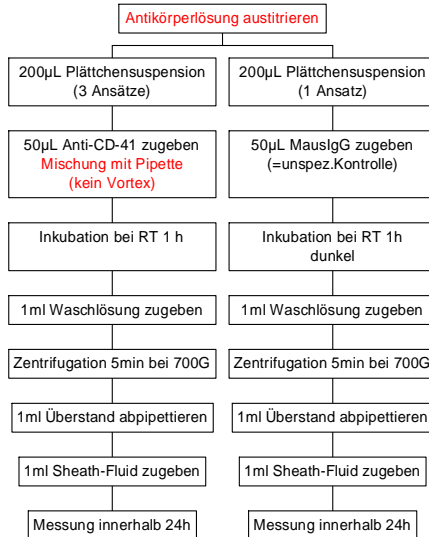


Abb. 2.23 : CD41-Markierung

2.9.10.6 Thrombozyten-Adhäsion an Leukozyten (CD41 positive Leukozyten)

2.9.10.6.1 Beschreibung des Tests

Plättchenaktivierung führt zu einer Aggregation zwischen den Thrombozyten und dem Gefäßendothel, sowie zwischen Thrombozyten und polymorphkernigen Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und anderen Thrombozyten. Grund sind die Aktivierung bzw. Expression von Adhäsionsmolekülen über die Wege der biochemischen Signalübermittlung. Das hier auch untersuchte P-Selektin (CD62P) wird beispielsweise rasch an der Oberfläche von aktivierten Plättchen exprimiert und fungiert als Rezeptor für Oligosaccharide, etwa der Monozytenmembran. Binden die Zellen an lokal aktiviertes Endothel entsteht in Folge der Nidus als Ausgangsort für die weitere Anheftung von Plättchen, die über einen aktivierten gpIIb/IIIa-Rezeptor wasserlösliches Fibrinogen anziehen. Im weiteren Verlauf der Vernetzung werden weiße Blutzellen über die β 2-Integrin-Liganden der Plättchen irreversibel an die Plättchenoberfläche gebunden. In viel geringerem Masse vollzieht sich diese Interaktion auch in fließendem Blut ohne Aktivierungsreiz im Sinne eines Gleichgewichts. Die Beobachtung der dauerhaften Anheftung von CD41-markierten Thrombozyten an Leukozyten ermöglicht Aussagen über den Zustand der

Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung durch den Kontakt mit der unphysiologischen Kunststoffoberfläche.

2.9.10.6.2 Methode

Den Vollblutproben werden je 20µl Anti-CD41-FITC, den Autofluoreszenzkontrollen 20µl PBS (Autofluoreszenz), sowie den NegativeStaining-Kontrollen 20µl Mouse IgG1-FITC Nr. 0639 Clone 679.1Mc7 zugegeben. Die Ansätze werden mit einer Transferpipette durchmischt und für 30min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Nach Zugabe von 2ml (Konz. 1:10) werden die Ansätze sanft gevortext und 10min inkubiert. Es folgt die Zentrifugation für 10min bei 300G und das Absaugen des Überstands bis auf 50µl Restflüssigkeit im Probenröhrchen. Zugabe von 1ml einfach-PBS mit 0,1% NaAzid und erneutes Vortex, bevor eine Zentrifugation bei 300G für 5min folgt. Resuspension des Pellet nach Absaugen des Überstands mit 0,5ml 0,5%-Formaldehyd. Lagerung der Proben auf Eis bis zur durchflußzytometrischen Messung innerhalb von 60min.

2.9.10.7 Fibrinogen-Leukozyten-Aggregation

2.9.10.7.1 Monoklonaler Fibrinogen-Antikörper mit Sekundärmarkierung

2.9.10.7.1.1 Beschreibung des Tests

Das Gerinnungsprotein Fibrinogen wird als zentrales Protein des Gerinnungssystems angesehen und wird in ähnlicher Form ($A\alpha, B\beta, \gamma$)₂ in allen Wirbeltieren gefunden. Während des Gerinnungsprozesses wird Fibrinogen von Thrombin in die Fibrinopeptide A und B (Monomere) gespalten und aus diesen Fibrin (α, β, γ)₂ gebildet. Das entstandene, Fibrin formt sich in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen zu einer unlöslichen gel-artigen Substanz, deren kovalente Stabilisierung durch weitere Faktoren erhöht wird. Trotz der physischen Umwandlung enthält das entstandene Fibrin weiterhin ca. 98% der ursprünglichen Fibrinogenstruktur und somit auch etliche Fibrinogenepitope.

Zum Einsatz kommt der monoklonale Anti-Human-Fibrinogen-AK der Fa. Sigma, St.Louis, USA, Nr. F-9902. Dieser Antikörper entstammt der Spezies Mouse IgG2a und ist gegen humanes Fibrinogen gerichtet. Da eine Fluoreszenzmarkierung fehlt, muss der primäre Antikörper mit einem Sekundärantikörper fluoreszenzmarkiert

werden. Hierfür wird der Goat-Anti-Mouse R-Phycoerythrin-Conjugate-Antikörper, Nr. 0551 der Fa.Coulter, Krefeld, Deutschland,, verwendet. Dieser entstammt der Spezies Goat und ist gegen die Spezies Mouse gerichtet. Das Negative Staining erfolgt hier mit Mouse IgG1-PE der Fa. Coulter, Nr. 0670 und Goat-IgG1-PE der Fa. Sigma,St.Louis, USA, Nr. 9787.

Fibrinogen wird als eigenständiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen angesehen. Erhöhte Fibrinogenkonzentrationen werden außerdem bei malignen Prozessen und Gewebnekrosen beachtet. Die Beobachtung der Fibrinogenanheftung an Leukozyten könnte den Aktivierungszustand des Gerinnungssystems durch den Blutkontakt mit der unphysiologischen Oberfläche der Kunststoffschläuche aufzeigen.

2.9.10.7.1.2 Methode

178µL des aliquotierten Fibrinogen-Antikörper F-9902 wird durch 882ml PBS – Zugabe auf eine Arbeitskonzentration von 1:100 eingestellt. Die Proben aus den Versuchen werden in Plättchensuspensionen mit 50.000 Thr/µl überführt. 100µl der Plättchensuspension werden jeweils entweder mit 25µl Fibrinogen-AK, 25µl der Isotypkontrolle oder 25µl Waschlösung (3,8% tri-NaCitrat-Dihydrat in PBS pH 7,2) für die Autofluoreszenzkontrolle zugegeben. Nach Mischung mit einer Transferpipette und Inkubation für 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur werden je Ansatz 2ml Waschlösung zugegeben und nach Vortex für 10min bei 1400rpm zentrifugiert. Der Waschvorgang wird wiederholt und nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand bis auf 100µl abgehoben. Nun Zugabe von 10µl Anti-Mouse-IgG1-PE in die Ansätze, die mit dem Fibrinogen-AK in Kontakt waren und Inkubation für 30min. Alle anderen Ansätze (Isotypkontrolle, Autofluoreszenz) erhalten 1ml 1%-Paraformaldehyd und werden auf Eis gelagert. Nach Inkubationsende werden 2ml Waschlösung zugesetzt und die Ansätze gemischt. Nach Zentrifugation bei 1400rpm für 10min wird der Überstand abgehoben und der Waschvorgang wiederholt. Nach der zweiten Wäsche wird das Pellet in 1ml 1%-Paraformaldehyd resuspendiert und auf Eis max.60min bis zur Messung gelagert.

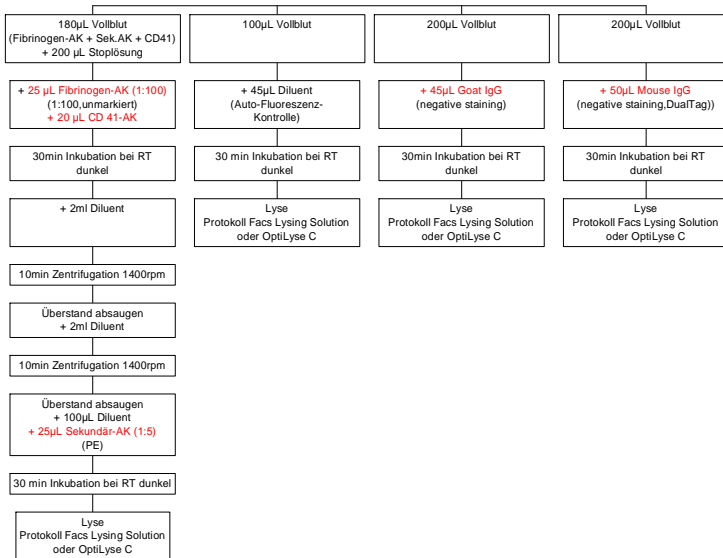


Abb.: 2.24 : Markierungsvorgang für Monoklonalen Fibrinogen-Antikörper

2.9.10.7.2 Polyklonaler Fibrinogen-Antikörper mit Sekundärmarkierung

2.9.10.7.2.1 Beschreibung des Tests

Zum Einsatz kommt der polyklonale Anti-Human-Fibrinogen-AK der Fa. Sigma, St.Louis,USA, Nr. F-2506. Dieser Antikörper entstammt der Spezies Goat und ist gegen humanes Fibrinogen gerichtet. Da eine Fluoreszenzmarkierung fehlt, muss der primäre Antikörper mit einem Sekundärantikörper fluoreszenzmarkiert werden. Hierfür wird der Anti-Goat-R-Phycoerythrin-Conjugate-Antikörper, Nr. P9787, des gleichen Herstellers verwendet. Dieser entstammt der Spezies Rabbit und ist gegen die Spezies Goat gerichtet. Das Negative Staining erfolgt hier mit Goat IgG PE der Fa. Sigma, St.Louis,USA, Nr. 9783 und Rabbit IgG-PE der Fa. Sigma,St.Louis, USA, Nr. 9788.

2.9.10.7.2.2 Methode

18µL des aliquotierten Fibrinogen-Antikörper F-2506 werden durch 882ml PBS – Zugabe auf eine Arbeitskonzentration von 1:100 eingestellt. Die Proben aus den Versuchen werden in Plättchensuspensionen mit 50.000 Thr/µl überführt. 100µl der Plättchensuspension werden jeweils entweder mit 25µl Fibrinogen-AK, 25µl der Isotypkontrolle oder 25µl Waschlösung (3,8% tri-NaCitrat-Dihydrat in PBS pH 7,2) für die Autofluoreszenzkontrolle zugegeben. Nach Mischung mit einer Transferpipette und Inkubation für 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur werden je Ansatz 2ml Waschlösung zugegeben und nach Vortex für 10min bei 1400rpm zentrifugiert. Der Waschvorgang wird wiederholt und un nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand bis auf 100µl abgehoben. Nun Zugabe von 10µl Anti-Grat –IgG-PE in die Ansätze, die mit dem Fibrinogen-AK in Kontakt waren und Inkubation für 30min. Alle anderen Ansätze (Isotypkontrolle, Autofluoreszenz) erhalten 1ml 1%-Paraformaldehyd und werden auf Eis gelagert. Nach Inkubationsende werden 2ml Waschlösung zugesetzt und die Ansätze gemischt. Nach Zentrifugation bei 1400rpm für 10min wird der Überstand abgehoben und der Waschvorgang wiederholt. Nach der zweiten Wäsche wird das Pellet in 1ml 1%-Paraformaldehyd resuspendiert und auf Eis max.60min bis zur Messung gelagert.

2.9.10.7.3 Fibrin-Adhäsion an Thrombozyten

2.9.10.7.3.1 Beschreibung des Test

Für diesen Test wurde der monoklonale Fibrin-Antikörper Nr. 0541, Clone E8 der Fa.Coulter, Krefeld, Deutschland, ausgewählt. Es handelt sich um einen AK der Isotypklasse IgG1-Mouse, der nicht fluoreszenzmarkiert ist und daher mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper Goat-anti-Mouse-IgG1-R-PE Nr. 0551 des gleichen Herstellers markiert werden muss. Als Isotypkontrollen kommen Mouse IgG1-PE (Nr. 0670, Fa.Coulter, Krefeld, Deutschland) und Goat-IgG-PE (Nr. 9783 Sigma, St.Louis, USA,) zur Anwendung.

2.9.10.7.3.2 Methode

18µL des aliquotierten Fibrinantikörper 0541 werden durch 882ml PBS –Zugabe auf eine Arbeitskonzentration von 1:100 eingestellt. Die Proben aus den Versuchen werden in Plättchensuspensionen mit 50.000 Thr/µl überführt. 100µl der

Plättchensuspension werden jeweils entweder mit 25µl Fibrin-AK, 25µl der Isotypkontrollen oder 25µl Waschlösung (3,8% tri-NaCitrat-Dihydrat in PBS pH 7,2) für die Autofluoreszenzkontrolle zugegeben. Nach Mischung mit einer Transferpipette und Inkubation für 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur werden je Ansatz 2ml Waschlösung zugegeben und nach Vortex für 10min bei 1400rpm zentrifugiert. Der Waschvorgang wird wiederholt und nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand bis auf 100µl abgehoben. Nun Zugabe von 10µl Anti-Mouse-IgG1-PE in die Ansätze, die mit dem Fibrin-AK in Kontakt waren und Inkubation für 30min. Alle anderen Ansätze (Isotypkontrolle, Autofluoreszenz) erhalten 1ml 1%-Paraformaldehyd und werden auf Eis gelagert. Nach Inkubationsende werden 2ml Waschlösung zugesetzt und die Ansätze gemischt. Nach Zentrifugation bei 1400rpm für 10min wird der Überstand abgehoben und der Waschvorgang wiederholt. Nach der zweiten Wäsche wird das Pellet in 1ml 1%-Paraformaldehyd resuspendiert und auf Eis max.60min bis zur Messung gelagert.

2.9.10.7.4 CD62P-Adhäsion auf Thrombozyten

2.9.10.7.5 Beschreibung des Tests

CD62P (Synonyme P-Selektin, GMP-140, PADGEM) gehört zur Familie der Selektine und wird durch Translokation nach Aktivierung von Plättchen in-vivo und in-vitro an der Oberfläche der Zellen präsentiert. Im Ruhezustand lässt es sich an α -Granula der Thrombozyten, in Megakaryozyten und in Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen nachweisen. CD62P spielt eine Rolle in der Interaktion von aktivierten Plättchen und Monozyten, sowie Neutrophilen. Beobachtet wurde außerdem ein Zusammenspiel bei der Zytoadhäsion von Plasmodium falciparum-infizierten Erythrozyten mit Thrombozyten und vaskulärem Endothel.

Verwendung findet der CD62P-Antikörper Nr.IM-1164 Clone CLBThromb/6, der Fa. Coulter, Krefeld, Deutschland. Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper der Klasse Mouse-IgG1, der für die Durchflußzytometrie mit FITC markiert ist. Als Isotypkontrolle wird Mouse-IgG1-FITC/Mouse-IgG2a-PE-Dual-Tag Nr. IM1983 des gleichen Herstellers angewendet.

2.9.10.7.5.1 Methode

Aus den Versuchsproben werden jeweils Plättchensuspensionen hergestellt und 100µL davon mit 25µl CD62P-Antikörper Nr.1164 nach Mischung mit einer Transferpipette für 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Isotypkontrollansätze erhalten statt Antikörpern entsprechend 25µL Mouse-IgG1-FITC/Mouse-IgG2a-PE-DualTag Nr. F-0528, bzw. 25µl Waschlösung (3,8%-TriNaDihydrat) für die Autofluoreszenzkontrolle. Nach Ablauf der Inkubation wird 2ml Waschlösung zugegeben, der Ansatz durchmischt und 10min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und wieder 2ml Waschlösung zugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10min bei 1400rpm und Absaugen des Überstands wird das Pellet in 1ml 1%-Paraformaldehyd fixiert und bis zur Messung max. 60min auf Eis gelagert.

2.10.0 Zellzahlen

2.10.1 Beschreibung des Tests

Die Bestimmung der Zellzahlen in den Testansätzen gehört zum Standard der Bestimmungen. Die Änderung der Zellzahlen kann im Versuchsdurchlauf verschiedene Ursachen haben. Einerseits könnten Erythrozyten durch mechanische Einflüsse lysiert werden, Thrombozyten und Leukozyten durch Aggregatbindung im Zell-Counter am Versuchsende durch niedrigere Zellzahlen auffallen, andererseits eine Adhäsion aller drei Zellreihen an der Innenfläche der Kunststoffloops zu geringeren Zellzählungen in den Ansätzen führen.

Die Messung der Zellzahlen in den Proben erfolgt vor und nach den Loop-Durchläufen.

2.10.2 Methode

Die Zellzahlen werden jeweils zu den Zeitpunkten 0 Minuten (Leerwert), 30min, 60min und 120min mit Hilfe eines Zählautomaten bestimmt. Erfasst werden Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahl.

2.11.0 Humorale Marker

2.11.1 TAT-micro Assay (Enzymimmunotest zur Bestimmung von Human-Thrombin/AT-III-Komplex)

2.11.1.1 Beschreibung des Tests

Die Umwandlung von Prothrombin zu aktivem Thrombin stellt ein zentrales Ereignis im Ablauf der Gerinnungskaskade dar. Thrombin wirkt auf verschiedene physiologische Substrate wie Fibrinogen, Protein C und Plättchen, ein und wird durch Antithrombin III gehemmt, wobei ein inaktiver Proteinkinase/Inhibitor-Komplex gebildet wird, der quantitativ durch einen Enzymimmunoassay erfasst werden kann. Untersuchungen auf Thrombin-Antithrombinkomplexe werden bei der Differentialdiagnose der disseminierten intravasalen Gerinnung, zur Überwachung bei Thrombembolierisiken, Verdacht auf intravasale Gerinnung und auch als Marker bei Leberkarzinomen angewendet. Für die Bestimmung der Human-Thrombin/AT-III-Komplexe kommt der Enzymimmunoassay „Enzymgnost® TAT micro“ der Fa. Behring, Marburg, Deutschland, Nr. 0329, zur Anwendung. Es handelt sich um einen Sandwich-ELISA, bei dem während der ersten Inkubation in der Probe enthaltene TAT-Komplexe an die mit Antikörpern gegen Thrombin beschichtete Kunststoffoberfläche der Mikrotiterplatten gebunden werden. Nach Auswaschen des nicht gebundenen Substrats werden in der zweiten Inkubationszeit Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Human-AT-III an die freien AT-III-Determinanten gebunden und nach einem weiteren Waschvorgang wird die gebundene Enzymaktivität gemessen (Enzymatische Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Chromogen). Die TAT-proportionale Farbkonzentration kann schließlich photometrisch bestimmt werden.

2.11.1.2 Methode

Nach Vorlegen von 50µL Probenpuffer TAT in die Mikrotiterplatte wird jeweils 50µL Plasma der verschiedenen Loops zu den Zeitpunkten 0, 60 und 120 min, sowie eine Kontrolle und ein Standart einpipettiert. Die Testplatte wird vorsichtig geschüttelt um eine Durchmischung zu erwirken. Es folgt die Inkubation nach Abkleben der Mikrotiterplatte mit Folie bei 37°C für 15min. Die Folie wird entfernt, die Vertiefungen mit einer Einmalglaspipette abgesaugt, pro Vertiefung 0,3ml verdünnte Waschlösung eingefüllt und wieder mit einer Pipette abgesaugt. Der Waschvorgang wird zweimal

wiederholt und die Platte auf Zellstoff ausgeklopft um Reste der Waschlösung zu entfernen. Nach Zugabe von 100µL Konjugat in jede Vertiefung folgt erneutes Abkleben mit Folie und 15min Inkubation bei 37°C. Während der Inkubation wird 10ml Puffer/Substratlösung in eine Chromogenabfüllung gegeben und unter Schütteln gelöst. Alle Vertiefungen werden ausgesaugt und nach obigem Schema zweimal gewaschen, gefolgt von Ausklopfen auf Zellstoff. Nach Zugabe von 100µL Substrat/Puffer-Lösung wird die Platte mit Folie abgedeckt und für 30min unter Lichtschutz bei 20-25°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 100µL Stoplösung in jede Vertiefung und die Messung innerhalb einer Stunden im Photometer gegen dest. Wasser bei einer Messwellenlänge von 492nm (490-500nm).

2.11.1.3 Testauswertung

Nach Berechnung des Extinktionsmittelwerte der Standards wird die Bezugskurve auf doppelt-logarithmischem Netzpapier erstellt (Abszisse : Konzentration 2 bis 80 µg/l, Ordinate : Extinktion 0-2). Aus der Bezugskurve können anhand der Extinktionswerte die TAT-Konzentrationen direkt abgelesen werden. Sollte die Extinktion außerhalb des durch Standards vorgegeben Bereichs liegen, müssen die Proben in anderen Verdünnungen nochmals getestet werden.

Der Erwartungswert / Referenzwert eines gesunden Erwachsenen (n=196) liegt bei 1,0-4,1µg/l (Median 1,5µg/l, Referenzbereich 2,5-97,5. Perzentile). Dieser Wert sollte dem Leerwert (Zeitpunkt 0) der Probanden entsprechen.

2.11.2 PMN-Elastase

2.11.2.1 Beschreibung des Tests

Die PMN-Elastase (34000 D) ist ein Enzym, welches sich außer im Pankreas auch neben anderen Proteasen in den Lysosomen von polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten findet. Benannt wurde diese Hydrolase aufgrund der Fähigkeit, Strukturen des elastischen Bindegewebes, wie Elastin und Proteoglykan, anzugreifen bzw. aufzulösen. Infolge verschiedener Stimuli, wie lokaler Gewebsirritationen und Infektionen bzw. Entzündungsreaktionen mit Phagozytose von Immunkomplexen kommt es, wie auch durch eine mechanische Schädigung, zur

Freisetzung von PMN-Elastase ins Plasma. Eine Möglichkeit der Induktion einer Elastaseliberierung steht im Zusammenhang der Fähigkeit von Neutrophilen, sich an entstehenden Thromben zu akkumulieren und, nach Einwanderung in dieselben, mit Fibrin in Interaktion zu treten. Vergebliche Versuche, Fibrin zu phagozytieren, führen hierbei zur Elastasefreisetzung.

Ein direkter Effekt auf die Degranulation von Elastase durch unphysiologische Oberflächen wird ebenfalls diskutiert, ein Faktor ist möglicherweise die Aktivierung des Komplementsystems, welche wiederum durch die, nach Fremdoberflächenkontakt gebildeten, Proteine β -F XIIa und Kallikrein induziert wird. Außerdem stellt der Komplementfaktor C5a einen wichtigen Aktivator von PMN dar. Ein chemotaktischer Einfluß sowie die Aggregation und Degranulation polymorphkerniger Granulozyten kann auch direkt auf den Einfluß von F XIIa und Kallikrein zurückzuführen sein, ebenso könnte PF 4 in der Lage sein, PMN-haltige Granulozyten zu aktivieren. Elastase besitzt ein sehr breites Wirkungsspektrum. Zu den spaltbaren Substraten zählen die C3- und C5Komplementfaktoren, Immunglobuline, Elastin, Kollagen und Proteoglykane, aber auch eine Reihe von Gerinnungsfaktoren (Fibrinogen) sowie deren Inhibitoren. Unter die letztere Gruppe fallen das Antithrombin III Plasminogen, der Heparin-Kofaktor II der C1Inhibitor und der α 2-Plasmin-Inhibitor.. Lysosomale Enzyme werden in Zusammenhang mit der Entstehung einer Pneumonie oder eines "adult respiratory distress syndrome" (ARDS) gebracht. Dies ist wiederum ein Erscheinungsbild des nach EKZ beobachteten Post-Perfusions-Syndroms.

Bei dem angewendeten heterogenen Enzymimmunoassay PMN-Elastase, Produkt # 1.12589 der Fa. Merck handelt es sich um einen Test zur spezifischen Bestimmung der PMN-Elastase aus polymorph-nukleären Leukozyten im Komplex mit PMN Elastase- α_1 Proteinaseinhibitor (PI). Der Test basiert auf dem Sandwich-ELISA-Prinzip, bei dem im ersten Inkubationsschritt der in der Probe enthaltene PNM-Elastase- α_1 /PI-Komplex mit seinem PMN-Anteil durch an die Wände der Vertiefungen in der Mikrotiterplatte gekoppelten Antikörper gebunden wird. Im zweiten Inkubationsschritt werden mit alkalischer Phosphatase (AP) markierte Antikörper zugesetzt, die mit dem α_1 -PI-Teil des Komplexes reagieren. Nach Entfernen der überschüssigen AP-markierten Antikörper durch einen Waschschrift wird die enzymatische Aktivität der über Immunkomplexe gebundenen AP

photometrisch bestimmt. Die Menge des gebildeten Farbstoffs ist der Konzentration der PMN-Elastase- α_1 -PI direkt proportional.

2.11.2.2 Methode

Zunächst erfolgt die Verdünnung von je 50 μL der Proben mit 2500 μL Verdünnungsmedium.. Nach Einpipettieren von je 1000 μL Waschlösung und Inkubation für 5-20 min bei 20 bis 25°C werden die Röhrrchen mittels Einmal-Glaspiette vollständig abgesaugt. Es folgt die Zugabe von je 500 μL der Probenlösung und Inkubation für 60 min bei 20 bis 25 °C mit anschließender Absaugung des Röhrrchen mit einer Pipette. Die gleichen Schritte werden mit je 500 μL des Verdünnungsmediums, den Kalibratoren 1-4 und dem Kontrollplasma durchgeführt. Nach dreimaliger Reinigung der Ansätze mit 1000 μL Waschlösung und vollständiger Absaugung der Reinigungslösung werden 500 μL Antikörper-Enzym-Lösung zugesetzt und die Ansätze für 30 min bei 20 bis 25°C inkubiert. Die Röhrrchen werden wiederum vollständig abgesaugt. Es werden zwei Reinigungsschritte mit Zugabe von je 2000 μL Waschlösung und anschließendem Absaugen angeschlossen. Nach Zugabe von je 500 μL Substratlösung und Inkubation / Reaktionszeit für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wird die Enzymreaktion durch 100 μL Stopplösung je Röhrrchen und mischen mittels Transferpipette unterbrochen.

Die Messung der Ansätze erfolgt innerhalb einer Stunde photometrisch als Extinktionswert gegen ein Leerwertgemisch aus 500 μL Substratlösung und 100 μL Stopplösung.

2.11.2.3 Testauswertung

Für die Auswertung des Tests erfolgt zunächst die Berechnung des Mittelwerts der Extinktionen aus den Doppelbestimmungen. Die Extinktion des Reagenzienkontrollwertes soll unter 30% der Extinktion von Kalibratoransatz 4 betragen. Bei höheren Werten liegen Messfehler oder eine Schädigung des Antikörper-Enzym-Konjugats vor. Auf dem im Test-Kit enthaltenen Auswertebogen werden die Extinktionen der Kalibratoren 1-4 gegen die auf den Etiketten angegebenen Konzentrationen an PMN-Elastase aufgetragen. Durch die sich ergebenden Punkte wird die Kalibrationskurve gelegt, welche für einen Tag

verwendet werden kann. Die Konzentrationen der Kontrolle und der Proben werden aus der Kalibrationskurve abgelesen und mit dem Verdünnungsfaktor 51 multipliziert, das Ergebnis liegt in der Einheit $\mu\text{g/L}$ vor.

2.11.3 β -TG (Enzymimmunologischer in-vitro Test zur quantitativen Bestimmung von β -Thromboglobulin)

2.11.3.1 Beschreibung des Tests

„ β -TG“ wird in alpha-Granula der Plättchen gespeichert und nach Aktivierung in großer Menge abgegeben. Es wird alternativ als Pro-platelet basic protein (PPBC) bezeichnet. Platelet-basic-protein wird als 15kD schweres Precursorprotein und nach proteolytischer Abspaltung entweder in LA-PF4 (Low affinity platelet factor 4) oder CTAP-3 (Connective tissue activating protein 3) überführt. Weitere Abspaltungen von CTAP-3 führen zur Bildung von β -TG. Die Abspaltung von drei Aminosäuren aus β -TG führt weiterhin zu NAP-2 (Neutrophil-activating protein 2). β -TG wird der Familie der chemotaktischen Zytokinen zugerechnet. Es wirkt stark chemotaktisch auf Fibroblasten und schwächer auf Neutrophile, stimuliert die Mitogenese, die Produktion von extrazellulärer Matrix, den Glucosemetabolismus und die Plasminogenaktivator-Synthese in Fibroblasten.

Der Asserachrome® β -TG der Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland Produkt # 1875370, ist ein enzymimmunologischer in-vitro-Test zur quantitativen Bestimmung von β -Thromboglobulin und beruht auf dem Sandwich-Assay-Prinzip. Während der ersten Immunreaktion binden die auf den Mikotitrationsstreifen fixierten spezifischen Antikörper gegen β -Thromboglobulin das β -TG der Probe, wobei β -TG mehrere antigene Determinanten besitzt. Folglich werden in der zweiten Immunreaktion mit POD-markierten β -TG-Antikörpern Sandwich-Komplexe gebildet, wobei die Menge der Sandwich-Komplexe ein Maß für den β -Thromboglobulingehalt der Probe darstellt. Im nachfolgenden Waschschrift (bound-free-separation) wird das nicht gebundene POD-Konjugat entfernt und nach Zusatz von Harnstoffperoxid sowie Chromogen (o-Phenylendiamin) die gebundene POD-Aktivität photometrisch bestimmt.

2.11.3.2 Methode

Vor Beginn des Enzymimmunoassays wird eine im Kit enthaltene Puffer-Lösung (L4, Verdünnung des Konzentrats auf 1:10 durch Aqua dest.) , sowie eine Waschlösung (Verdünnung des Konzentrats auf 1:20 durch Aqua dest.) hergestellt.

Aus den Chandler-Loops Leerwert ($t=0$), Heparin $t=60$ und $t=120$, sowie PVC $t=60$ und $t=120$ wird jeweils CTAD-Blut entnommen und das Entnahmeröhrchen 15min auf Eis gestellt, um innerhalb einer Stunde 30min in der Kühlzentrifuge ($2-8^{\circ}\text{C}$) bei 2000G zentrifugiert zu werden. Nach Zentrifugation wird mit einer Einmalglaspipette aus dem mittleren Drittel des Plasmaüberstands eine Probe entnommen, wobei die Abnahme nahe der Oberfläche ebenso zu vermeiden ist wie die Abnahme nahe der Zellschicht. Die Probe wird durch Zugabe von 9 Teilen Puffer-Lösung (L4) zu einem Teil CTAD-Plasma verdünnt. Bei erhöhten β -TG-Konzentrationen erfolgt eine weiterer Verdünnungsansatz durch Zugabe von 19 Teilen Puffer-Lösung auf ein Teil Plasma. Von jedem bereits verdünnten Probenansatz werden $200\mu\text{L}$ in die Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen gegeben und die Streifen 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt die Absaugung der Vertiefungen und jeweils Zugabe von $250\mu\text{L}$ Waschlösung, Durchmischung und darauf folgende Absaugung. Der Reinigungsschritt wird insgesamt fünfmal wiederholt. Eine weitere Inkubation erfolgt nach Zugabe von jeweils $200\mu\text{L}$ Antikörper POD-Konjugat für 60min bei Raumtemperatur. Die bereits nach der ersten Inkubation durchgeführten 5 Reinigungsschritte werden wiederholt und nach dem letzten Aussaugen sofort im Zeittakt je $200\mu\text{L}$ Substrat zugegeben. Der Inkubationsschritt des Substrats wird im Zeittakt auf exakt 3min begrenzt und die Reaktion durch $50\mu\text{L}$ 3molarer Schwefelsäure unterbrochen. Die Ansätze werden 10min in Ruhe belassen und innerhalb von 2 Stunden photometrisch gegen die Puffer-Lösung (L4) gemessen.

2.11.3.3 Testauswertung

Für jede Mess-Serie ist eine Bezugskurve notwendig. Hierfür wird aus Lösung 6 (β -TG-Standard) eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt. Die gemessene Extinktion wird auf doppelt-logarithmischem Papier gegen IU/ml β -TG aufgetragen. Die alternative Verwendung von linearem Netzpapier gestattet eine bessere Ablesegenauigkeit für höhere Werte bei gleichzeitigem Verzicht auf eine lineare Kalibrationskurve. Für die Probenverdünnung 1:10 müssen die Werte direkt an der

Bezugskurve abgelesen werden, bei anderen Verdünnungen sind sie mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

2.11.4 Enzymgnost F 1+2 micro (Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Human-Prothrombinfragment 1+2)

2.11.4.1 Beschreibung des Tests

Die Umwandlung von Prothrombin zum aktiven Thrombin unter Bildung von Fragmenten stellt ein zentrales Ereignis im Ablauf der Gerinnungskaskade dar. Mit der immunchemischen Bestimmung von Prothrombinfragment F1+2 wird eine exakte Quantifizierung der des tatsächlich gebildeten Thrombins möglich, wobei die Bedeutung des Prothrombinfragments F1+2 in der Diagnose hyperkoagulatorischer, bzw. thromboembolischer Ereignisse liegt. Erhöhte Werte werden bei Patienten mit Thrombosen, Lungenembolie, disseminierter interavasaler Gerinnung (DIC) etc. nachgewiesen. Eine Erhöhung des der F2+1-Konzentration wird bei Patienten mit hereditärem Protein C- bzw. Protein S-Mangel beschrieben, eine Herabsetzung der Konzentration bei Vorliegen einer oralen Antikoagulation.

Der Enzymgnost F1+2 micro-Immunoassay der Fa. Behring, Marburg, Deutschland, Nr. 0650 ist ein EISA nach Sandwichprinzip zur in-vitro-Bestimmung von humanem Prothrombinfragment F1+2 aus Plasma. Während der ersten Inkubation bindet sich das in der Probe vorhandene F1+2-Antigen an die Antikörper gegen F1+2, die an der Oberfläche der Mikrotiterplatte fixiert sind. Nach Auswaschen werden in einer zweiten Reaktion Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Human-Prothrombin an die freien F1+2-Determinanten gebunden . Nach Substratzugabe wird die Enzymaktivität gemessen. Die der Konzentration proportionale Farbintensität wird photometrisch bestimmt. Standards decken den Konzentrationsbereich von 0,04-10nmol/l ab. Der Referenzbereich liegt bei 0,4-1,1nmol/l in Citratplasma gesunder Probanden.

2.11.4.2 Methode

Nach Festlegung der benötigten Riegel (Mikrotiterstreifen) werden 50µl Probenpuffer F1+2 in jede Vertiefung vorgelegt und weiterhin je 50µl Standart, Kontrolle oder

Probe vorgelegt. Nach dem Füllen der Testplatte wird diese kurz geschüttelt, um vollständiges Durchmischen zu gewährleisten.

Inkubation bei 37°C für 30min und Absaugen aller Vertiefungen. Durch Zugabe von je 0,3ml verdünnter Waschlösung und Absaugen wird die Wäsche zweimal wiederholt. Die Platte wird auf Zellstoff ausgeklopft und 100µl Konjugat in jede Vertiefung gegeben. Nach 15min Inkubation bei 37°C wird nochmals dreimal gewaschen (s.o.) und die Testplatte ausgeklopft. Nach Zugabe von 100µl frisch angesetzter Cromogen-Puffer/Substrat-Lösung erfolgt eine weitere 15-min.-Inkubation. Es werden 100µL Stopp-Lösung in jede Vertiefung einpipettiert und der Ansatz innerhalb einer Stunde bei 492nm gegen dest. Wasser photometrisch gemessen.

2.11.4.3 Auswertung

Nach Berechnung der Extinktionsmittelwerte der Standards wird die Bezugskurve erstellt (Abszisse : Konzentration 0,0,4-10nmol/l, Ordinate : Extinktion 0-2) . Die Werte der Proben und Kontrollen können durch den Eintrag der optischen Dichten aus dieser Kalibrierungskurve entnommen werden.

2.11.5 SC5b-9

2.11.5.1 Beschreibung des Tests

Der terminale Komplement Komplex (TCC) entsteht nach Komplementaktivierung aus Komplementfaktor C5 über Komplementfaktor C9. Der Membrane Attack Complex (MAC), der eine Form des TCC darstellt, ist ein stabiler Komplex, der als Mediator für die irreversible Zellmembranschädigung zu Abwehrzwecken fungiert. Komplexe, die in Abwesenheit einer Zielmembran gebildet werden, binden an ein natürlich gebildetes Regulatorprotein (Protein S). Dieses Protein S verbindet sich mit entstehenden C5b-9-Komplexen während der C5b-7-Stufe der Komplementkaskade. Somit ist der SC5b-9-Komplex eine wasserlöslich, nicht lytisch-ative Form des TCC. Der SC5b-9-Komplex ELISA-Kit der Fa. LD-Diagnostica , Heiden, Deutschland, Nr. A009 misst die SC5b-9-Konzentration in humanem Serum oder Plasma. Hiermit kann eine Aussage über den Zustand der Komplementaktivierung im terminalen Teil der Aktivierung gemacht werden. Es wird im Rahmen der ELISA-Sandwichttechnik ein

monoklonaler Antikörper gegen den Komplex verwendet und im zweiten Schritt der Reaktion ein Peroxidase beladenes Konjugat mit Antikörpereigenschaften gegen den Komplex zugegeben. Nach Substratzugabe kommt es zur enzymatischen Spaltung unter Auftreten eines Farbwechsels, der photometrisch bestimmt werden kann.

2.11.5.2 Methode

Für den Test wird Plasma, bzw. Serum hergestellt, welches innerhalb von 4 Stunden, auf Eis gelagert, dem Test zugeführt werden muss. Plasmaproben werden 1:4 mit Verdünnungspuffer (Kit) verdünnt. Sowohl die hoch, als auch die schwach positive Kontrolle (Kit) wird im Verhältnis 1:25 mit Verdünnungspuffer verdünnt. Das Substrat für den zweiten Reaktionsschritt wird erst unmittelbar vor dem Einsatz angesetzt (Kit).

Je 300µl Waschpuffer-Gebrauchslösung werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und 2min stehen gelassen. Die Platte wird ausgeleert und mit Fliesspapier trocken geklopft. 100µl der Standards, der vorverdünnten Kontrollen und der vorverdünnten Proben werden in je eine Vertiefung der Platte pipettiert. Für den Leerwert werden 100µl Probenverdünnungspuffer einpipettiert. Abdecken der Platte und Inkubation bei Raumtemperatur für 60min. Anschließend wird die Platte gewaschen durch je fünfmal 300µl Waschpuffergebrauchslösung einpipettieren, 1 Minute Ruhezeit und Ausklopfen auf Fließpapier. Es werden 50µl Konjugat in jede Vertiefung gegeben und die Platte abgedeckt bei Raumtemperatur 60min inkubiert. Die Substratlösung wird vorbereitet. Die Platte wird dann wiederum fünfmal ausgewaschen (s.o.) und 100µl Substrat in jede Vertiefung pipettiert. Es folgt eine weitere Inkubation für 30min bis 50µl Stopplösung einpipettiert werden. Die Platte wird zur gleichmäßigen Farbmischung vorsichtig geschüttelt und bei 405nm innerhalb von 60min gegen den Leerwert gemessen.

2.11.5.3 Auswertung

Zur Auswertung wird eine Eichkurve erstellt, bei der die Konzentrationen der Standards auf der X-Achse und die korrespondierenden optischen Dichten auf der Y-Achse aufgetragen werden. Die Werte der Proben und Kontrollen können durch den Eintrag der optischen Dichten aus dieser Kalibrierungskurve entnommen werden. Die Ergebnisse werden in ng SC5b-9/ml angegeben.

2.12.0 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen Excel Xp mit Add-In WinSTAT 2.0 und mit SPSS in den Versionen 10.0.7 und 11.0.0. Für die einzelnen Messungen wurden jeweils ein deskriptiver Block, ein Block mit den in Frage kommenden nicht-abhängigen Students-T-Tests, sowie eine ANOVA mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Die Anwendung der ANOVA als Varianzanalyse setzt die Normalverteilung voraus, welche mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test, ergänzt durch den Chi-Quadrat-Test für diskrete Variablen, getestet wurde. Für die inhaltliche und methodische Schlüssigkeit der statistischen Auswertungen wurde von der Universität Tübingen beraten (Inst. für Biometrie und med. Informatik, Dr. Axmann).

2.13.0 Auflistung aller Labormaterialien

Blutentnahme	19G Butterfly Monovette neutral 9ml Monovette EDTA 9ml Monovette EDTA 5ml Monovette neutral 9ml 1UI/Heparin/ml Monovette neutral 9ml 10UI/Heparin/ml PVC-Behälter Liquemin, hochmolekular N25000	Abbott, Sligo, Rep.of Ireland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland eigene Herstellung aus Monovette und Liquemin eigene Herstellung aus Monovette und Liquemin
Rotationsmodell	ChandlerLoop	Hoffmann-LaRoche AG,Grenzach, Deutschland Universität Tübingen, HP.Wendel, Heller
Analysegeräte	Zell-Counter Durchflußzytometer EPICS-XL/MCL Photometer PM4 ELISA-Testgerät	Coulter, Krefeld, Deutschland Zeiss, Oberkochen, Deutschland Dynamed, Guernsay Islands, England
Schläuche	PVC-Schlauch 501mm, Durchmesser Carmeda-beschichteter Schlauch	Jostra Medizintechnik, Hirrlingen , Deutschland Medtronic
Antikörper	CD11B-QuantumRed R-3638 CD11C-PE IO-Test 1760 CD18-FITC (Anti-LFA-1-beta) 347953 CD41-FITC IO-Test 1756 CD62L-FITC (Anti-Leu-8) 347953 CD62P C-5713 Interleukin 1beta-FITC B-A-15 IL1-betaFI Interleukin 2-FITC 855.021.010 Interleukin TNF-alpha-FITC 855.161.010 HeatShockProtein 70 MA3-006 CellProbe Kallikrein-FITC 7547083 CellProbe DCFH-PMA,Oxidativer Burst-FITC 74547078 CellProbe Peroxidase-FITC 7547077 CellProbe AAPV-Elastase-FITC 7547071 CellProbe RGES-Elastase-FITC 7547104 Fibrin 0541 Fibrinogen monoklonal F-9902 Fibrinogen polyklonal F-2506 Goat-Anti-Mouse R-PE-Conjugate 0551 Rabbit-anti-Goat-Sekundär-AK Anti-Mouse-F(ab '2-PE-Sekundäntikörper # 0551 LeukoGATE CD45FITC/14PE 340040 IntraPrep Permeabilizing Reagent IM 2388	Sigma, St.Louis, USA Coulter, Krefeld, Deutschland Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland Coulter, Krefeld, Deutschland Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland Sigma, St.Louis, USA Dynacnone, Besancon, Frankreich Biotest, Dreieich, Deutschland Dynacnone, Besancon, Frankreich Fa. Affinity Bioreagents,Inc.Golden,CO,USA Coulter, Krefeld, Deutschland Coulter, Krefeld, Deutschland Coulter, Krefeld, Deutschland Sigma, St.Louis, USA Sigma, St.Louis, USA Sigma, St.Louis, USA Sigma, St.Louis, USA Coulter, Krefeld, Deutschland Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland Coulter, Krefeld, Deutschland
Lyse-Reagenzien	Opti-Lyse B IM 1400 Opti-Lyse C IM 1401	Coulter, Krefeld, Deutschland Coulter, Krefeld, Deutschland

	FACS Lysing Solution 92-0002 Ortho-Mune™-Lysing Solution	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland Ortho-Pharma, SLC, USA
Hilfsmittel Durchflußzytometrie	Sheath-Fluid (Trägerflüssigkeit)	Coulter, Krefeld, Deutschland
	FlowSet Fluorospheres PN6607007	Coulter, Krefeld, Deutschland
	FlowCheck Fluorospheres 6605359	Coulter, Krefeld, Deutschland
Kits für hum. Marker	PNM-Elastase 12589-ELISA	Merck, Deutschland
	Enzymgnost TAT-micro	Behringwerke AG, Marburg, Deutschland
	Asserachrome beta-Thromboglobulin 1875370	Behringwerke AG, Mannheim, Deutschland
	Prothrombinfragment F1+2 Enzyme Immunoassay	Behringwerke AG, Marburg, Deutschland
	SC5b-9 Enzyme Immunoassay A009	Quidel, San Diego, USA / LD Diagnostika Heiden, Deutschland
Isotypkontrollen	Mouse IgG1-PE Nr. 0670	Coulter, Krefeld, Deutschland
	Mouse-IgG1-FITC, Nr. 0639	Coulter, Krefeld, Deutschland
	Goat-IgG1-PE Nr. 9787	Sigma, St.Louis, USA
	Rabbit IgG-PE 9798	Sigma, St.Louis, USA
	Mouse IgG1-FITC/Mouse IgG2a-PE-DualTag F-0528	Sigma, St.Louis, USA
Reagenzien	ADP A66646 (Adenosin-di-Phosphat)	Sigma, St.Louis, USA
	PMA P-8139 (Phorbol-12-myristate-13-Azetat)	Sigma, St.Louis, USA
	FLMP F-3506 (N-formyl-L-methionin-L-leucyl-L-Phenylalanin)	Sigma, St.Louis, USA
	Kochsalzlösung phys.0,9%	Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland
	PBS	Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland
	HBSS (Hanks balanced saline solution)	Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland

3.0.0 Ergebnisse

3.1.0 Vergleich verschiedener Lyseverfahren

Die möglichst vollständige Lyse der Erythrozyten stellt für die durchflußzytometrische Messung der behandelten Ansätze einen integralen Teilschritt dar. Es ist zwar grundsätzlich möglich Messungen im Vollblut durchzuführen, doch die Größe der Erythrozyten und ihre Steuungseingeschaften für das Laserlicht lassen die Detektion von kleinen Partikeln, die hier Ziel der Untersuchungen sind, normalerweise kaum zu.

3.1.1 Ergebnisse Becton-Dickinson FACS Lysing Solution

3.1.1.1 FACS-Lyselösung bei Raumtemperatur

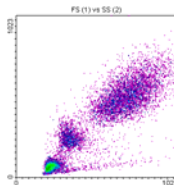


Abb. 3.1 : 87% Zellen in Gates erfasst, FS 240 GAIN 5,0, SS 360 GAIN 7,5

3.1.1.2 FACS-Lyselösung komplett auf Eis (1) (Röhrchen 10min leer auf Eis, Inkubation auf Eis, Zentrifuge auf 4°C gekühlt) –

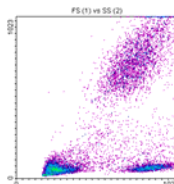


Abb. 3.2 : Gating erschwert bis unmöglich, Populationskontrolle mit CD45/14 empfohlen.

3.1.1.3 FACS-Lyselösung komplett auf Eis (2) (Röhrchen 10min leer auf Eis, Inkubation auf Eis, Zentrifuge auf 4°C gekühlt)

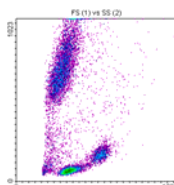


Abb. 3.3 : 84,8% Zellen in Gates, Populationszuordnung fraglich

3.1.2 Ergebnisse Coulter OptiLyse B

3.1.2.1 OptiLyse B bei Raumtemperatur

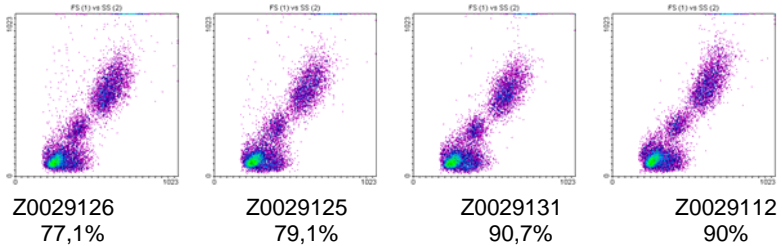


Abb. 3.4 : Messergebnisse OptiLyse B

3.1.2.2 OptiLyse B bei Raumtemperatur + 1 Wäsche

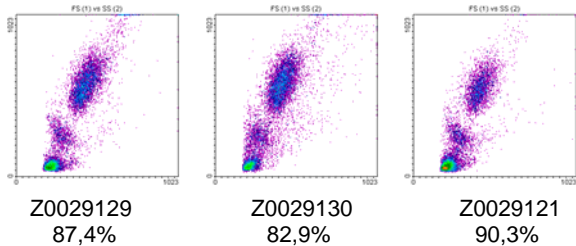


Abb. 3.5 : Messergebnisse OptiLyse B

3.1.2.3 OptiLyse B auf Eis

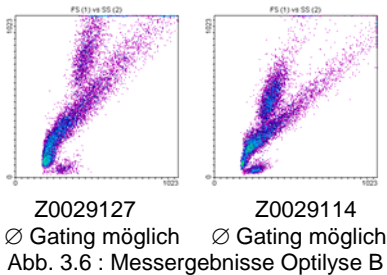
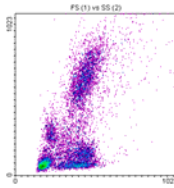


Abb. 3.6 : Messergebnisse OptiLyse B

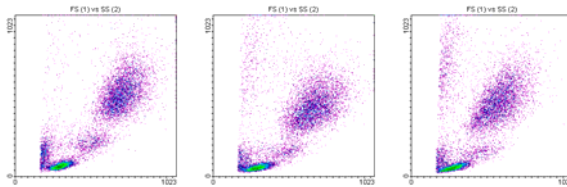
3.1.2.4 OptiLyse B auf Eis + Wäsche



Z0029135

Abb : 3.7 : 81,5% Zellen in Gates erfassbar, Populationskontrolle mit CD45/14 empfohlen.

3.1.2.5 Ergebnisse OrthoMune Lysing Solution



72, 6%

70, 9%

71, 9%

der Zellen erfassbar, bei insgesamt hohem Debrisanteil

Abb. 3.8 : Messergebnisse OrthoMune Lyse

3.1.2.6 Bewertung der Lyseverfahren

Die gesteten Lyseverfahren wurden auf ihre Reproduzierbarkeit mit gleichbleibend stabilen und vergleichbaren Ergebnissen hin getestet. Weiterhin ist ihre Fehlertoleranz und Störanfälligkeit ein Kriterium für die Auswahl eines Reagenzes und seines Einsatzes in der Analyseserie.

Die beste Erfahrungen wurden mit der FACS Lysing Solution der Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland, gemacht, die in der Serie zur Anwendung kam.

3.2.0 Durchflusszytometrische Bestimmungen

3.2.1 Oberflächenantigene CD11B, CD11C, CD18, CD62L

3.2.1.1 Optische Demonstration der Messergebnisse

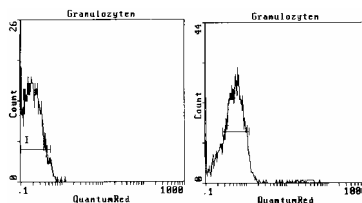


Abb. 3.9.: links : Autofluoreszenz im Granulozyten-Gate, rechts : Fluoreszenzaktivität im Granulozyten-Gate nach Markierung mit der Isotyp-Kontrolle (Negative Staining)

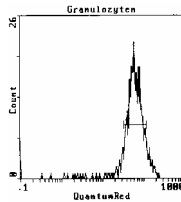


Abb. 3.10 : Fluoreszenz-Aktivität der CD 11B-markierten Zellen im Granulozyten-Gate

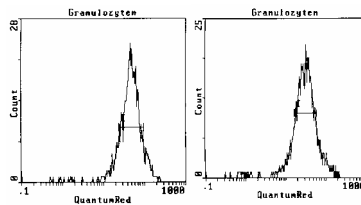


Abb. 3.11 : links : Fluoreszenzaktivität der CD 11B-markierten Zellen im Granulozyten-Gate nach 60min im heparin-beschichteten Schlauch, rechts : Fluoreszenzaktivität der CD 11B-markierten Zellen im Granulozyten-Gate nach 120min im heparin-beschichteten Schlauch

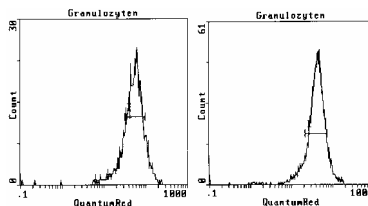


Abb. 3.12 links : Fluoreszenzaktivität der CD 11B-markierten Zellen im Granulozyten-Gate nach 60min im PVC-Schlauch, rechts : Fluoreszenzaktivität der CD 11B-markierten Zellen im Granulozyten-Gate nach 120min im PVC-Schlauch

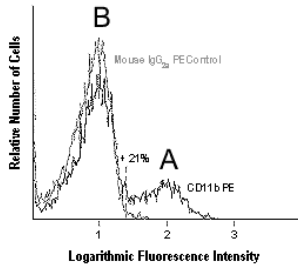


Abb. 3.13 : Ideale Messung des PE-markierten CD11B-Antikörpers (A) mit Abgrenzung der Fluoreszenzaktivität der Isotypkontrolle (B)

3.2.1.2 CD 11B

Lymphozyten

	Auto	CD 11B IgG1 PE NS	CD 11B PE Leerwert	CD 11B PE Heparin 60min	CD 11B PE PVC 60min	CD 11B PE Heparin 120min	CD 11B PE PVC 120min
gültige Fälle	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Mittelwert	0,122	0,164	1,629	2,208	1,664	1,685	1,720
Std.Fehler des MW	0,009	0,025	0,400	0,819	0,440	0,428	0,455
Varianz	0,001	0,006	1,597	6,701	1,937	1,835	2,071
Std.Abweichung	0,028	0,078	1,264	2,589	1,392	1,355	1,439
Median	0,109	0,131	2,290	2,010	1,990	2,185	2,140
geom. Mittelwert	0,120	0,153	0,885	0,987	0,926	0,924	0,997

Die Wertereihen enthalten einen Ausreißer (CD11B IgG1-PE Negative Staining, Wert = 0,375). Alle Werte außer der Autofluoreszenz sind normalverteilt.

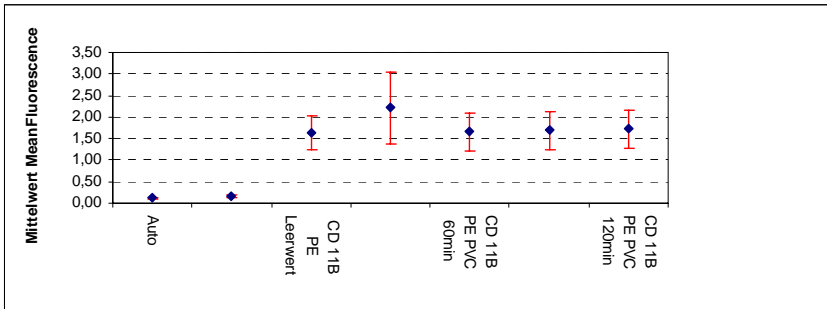
T-Test für unverbundene Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 60 min $p=0,532$, Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,925$, Leerwert gegen PVC 60min $p=0,953$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,88$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p=0,566$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,995$

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	11B NS	11B Leerw.	11B Hep. 60min	11B PVC 60min	11B Hep. 120min	11B PVC 120min
Auto	0,122	----	-4,19E-02	-1,5067	-1,67680	-1,54210	-1,56250	-1,59760
11B NS	0,164	Nein ($p=1,0$)	----	-1,46480	-1,6349	-1,500	-1,520	-1,5557
11B Leerw.	1,629	Nein ($p=0,139$)	0,172	----	-0,17010	-3,540E-02	5,58e-02	-9,09e-02
11B Hep. 60min	1,664	Nein ($p=0,056$)	0,071	Nein ($p=1,0$)	----	-0,13470	-0,11430	7,9e-02
11B PVC 60min	2,208	Nein ($p=0,115$)	0,143	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	----	-2,04e-02	-5,5e-02
11B Hep. 120min	1,685	Nein ($p=0,104$)	0,129	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	----	-3,51e-02

11B PVC 120min	1,720	Nein (p=0,086)	0,108	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----
----------------	-------	-------------------	-------	--------------	-----------------	-----------------	-----------------	------



Grafik 3.1 : MW und SF der CD11B –Messung in der Lymphozytenpopulation. Indifferente Schwankungen der Messwerte aus den Loops. Anstieg der Loop-Werte gegen Autofl./ NS.

Monozyten

	Autofluoreszenz	CD 11B IgG1 PE NS	CD 11B PE Leerwert	CD 11B PE Heparin 60min	CD 11B PE PVC 60min	CD 11B PE Heparin 120min	CD 11B PE PVC 120min
gültige Fälle	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Mittelwert	0,181	10,070	57,264	52,919	55,790	44,690	46,880
Std.Fehler des MW	0,008	3,500	11,562	8,435	5,872	7,487	3,737
Varianz	0,001	122,508	1336,842	711,473	344,819	560,585	139,628
Std.Abweichung	0,024	11,068	36,563	26,673	18,569	23,677	11,816
Median	0,169	4,158	67,050	51,650	48,450	31,800	43,050
geom. Mittelwert	0,180	3,003	27,429	35,789	53,235	39,888	45,720

Es finden sich keine Ausreißer. Alle Werte sind normalverteilt.

T-Test für unverbundene Stichproben:

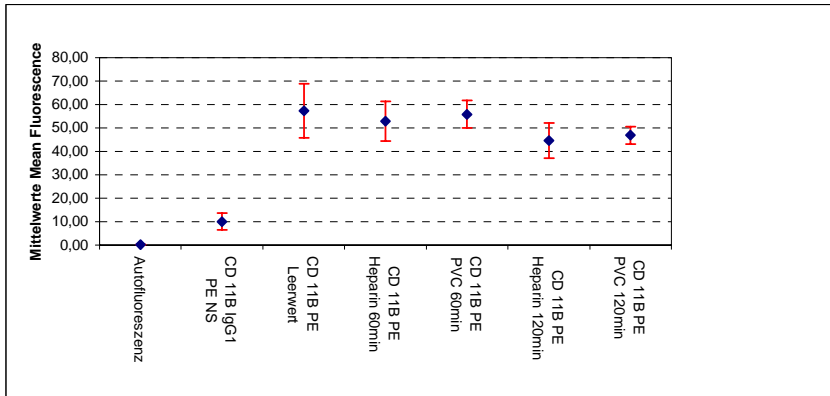
Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 60 min $p=0,76$, Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,37$, Leerwert gegen PVC 60min $p=0,91$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,40$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p=0,783$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,79$,

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	11B NS	11B Leerw.	11B Hep. 60min	11B PVC 60min	11B Hep. 120min	11B PVC 120min
Auto	0,1811	----	-9,8888	-57,08*	-52,737*	-55,608*	-44,508*	-46,69*
11B NS	10,0699	Nein (p=1,0)	----	-47,193*	-42,849*	-45,720*	-34,620*	-36,810*
11B Leerw.	57,2637	Ja	0,000	----	4,344	1,47370	12,573	10,3837
11B Hep. 60min	52,919	(p<0,001)	0,01	Nein (p=1,0)	----	-2,871	8,229	6,039
11B PVC 60min	55,79	Ja (p<0,001)	0,000	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	11,100	8,910

11B Hep. 120min	44,69	Ja (p<0,001) Ja	0,013	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-2,190
11B PVC 120min	46,88	(p<0,001)	0,06	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----



Grafik 3.2 : MW und SF der CD11B –Messung in der Monozytenpopulation. Nach Anstieg der MFI über die Autofl. /NS keine Änderungen bei den 60min-Werten gegenüber dem Leerwert, leichter Abfall der 120min-Werte geg. Leerwert (heparinbeschichtetes PVC > PVC)

Granulozyten

	Auto	CD 11B IgG1 PE NS	CD 11B PE Leerwert	CD 11B PE Heparin 60min	CD 11B PE PVC 60min	CD 11B PE Heparin 120min	CD 11B PE PVC 120min
gültige Fälle	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Mittelwert	0,197	0,634	37,880	25,687	45,260	15,682	39,880
Std.Fehler des MW	0,011	0,055	6,602	5,853	4,270	2,727	3,563
Varianz	0,001	0,030	435,915	342,568	182,303	74,369	126,953
Std.Abweichung	0,036	0,173	20,879	18,509	13,502	8,624	11,267
Median	0,206	0,679	25,150	17,750	41,750	11,950	44,400
geom. Mittelwert	0,193	0,593	33,526	20,623	43,280	14,002	37,847

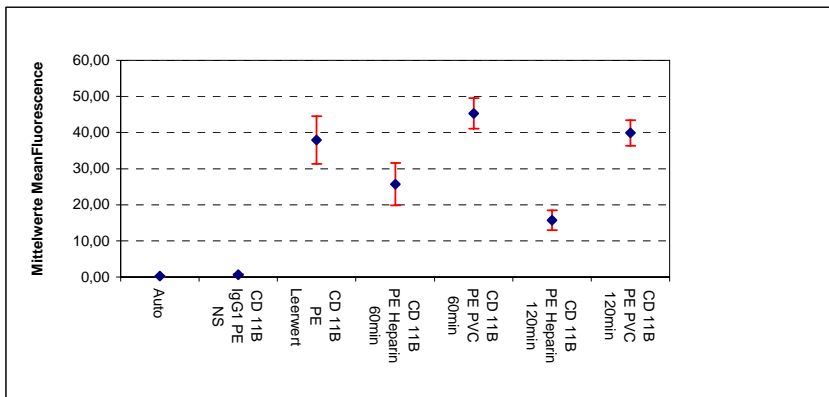
Außer CD11B IgG1 PE NS (1 Wert 1,161) finden sich keine Ausreißer. Alle Werte weisen Normalverteilung auf.

T-Test für unverbundene Stichproben:

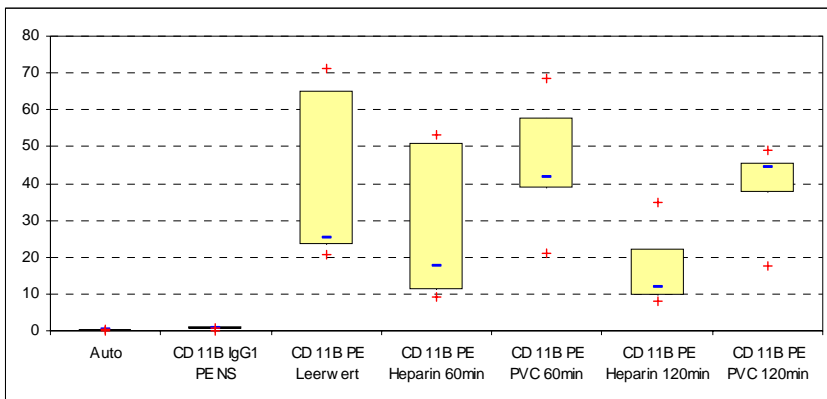
Leerwert gegen Heparin 60 min p=0,183, Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min p=0,0060, Leerwert gegen PVC 60min p=0,360, Leerwert gegen PVC 120min p=0,793, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min p=0,014, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min p<0,00103. **Signifikanter Unterschied zw. heparinbeschichtetes PVC 60min und PVC 60min**
Hochsignifikantere Unterschiede zw. heparinbeschichtetes PVC 120min und PVC 120min und zw. Leerwert und heparinbeschichtetem PVC 120min.

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	11B NS	11B Leerw.	11B Hep. 60min	11B PVC 60min	11B Hep. 120min	11B PVC 120min
Auto	0,1967	----	-0,437	-37,683*	-25,49*	-45,0633*	-15,4853	-39,6833*
11B NS	0,6341	1,0	----	-37,246*	-25,0529*	-44,626*	-15,048	-39,246*
11B Leerw. 60min	37,88	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,00$)	----	12,193	-7,380	22,198*	-2,000
11B PVC 60min	25,687	Ja ($p=0,001$)	Ja ($p=0,00$)	Nein ($p=0,804$)	----	-19,573*	10,00	-14,193
11B Hep. 120min	45,26	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,00$)	Nein ($p=1,0$)	Ja ($p=0,025$)	----	29,578*	5,380
11B Hep. 60min	15,682	Nein ($p=0,193$)	Nein ($p=0,24$)	Ja ($p=0,006$)	Nein ($p=1,0$)	Ja ($p<0,001$)	----	-24,198*
11B PVC 120min	39,88	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,01$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=3,47$)	Nein ($p=1,0$)	Ja ($p<0,01$)	----



Grafik 3.3 : MW und SF der CD11b –Messung in der Granulozytenpopulation. Abfall der MFI zwischen Leerwert und heparinbeschichtetem PVC 60min / 120min. Anstieg der MFI zwischen Leerwert und PVC 60min / 120min.



Grafik 3.4 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der CD11B –Messung in der Granulozytenpopulation. Abfall der MFI zwischen Leerwert und heparinbeschichtetem PVC 60min / 120min. Anstieg der MFI zwischen Leerwert und PVC 60min / 120min.

3.2.1.3 CD 11C

Lymphozyten

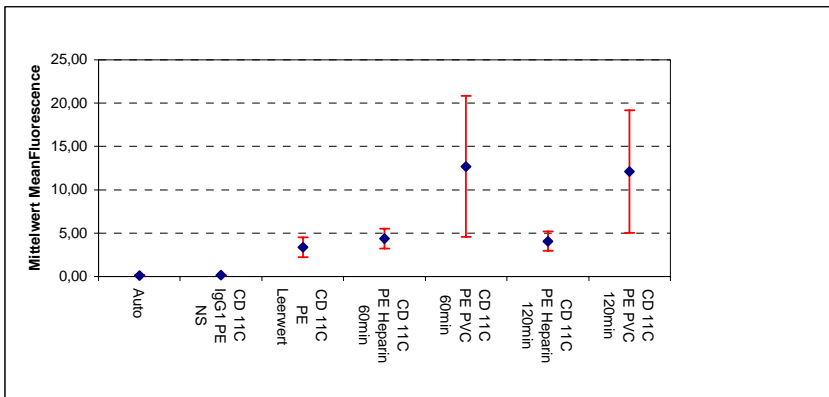
	Auto	CD 11C IgG1 PE NS	CD 11C PE Leerwert	CD 11C PE Heparin 60min	CD 11C PE PVC 60min	CD 11C PE Heparin 120min	CD 11C PE PVC 120min
gültige Fälle	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Mittelwert	0,122	0,130	3,368	4,357	12,704	4,079	12,119
Std.Fehler des MW	0,009	0,003	1,146	1,153	8,143	1,114	7,079
Varianz	0,001	0,000	13,127	13,288	663,046	12,407	501,106
Std.Abweichung	0,028	0,010	3,623	3,645	25,750	3,522	22,385
Variationskoeffizient	0,229	0,079	1,076	0,837	2,027	0,864	1,847
Median	0,109	0,128	2,190	5,880	6,115	5,060	6,025
geom. Mittelwert	0,120	0,130	1,277	1,926	3,249	1,905	3,543

Ausreißer im Datenbestand (CD11C-PE PVC 60min Wert 85,4; CD11C-PE PVC 120min Wert 74,8), alle Wertereihen **außer Autofluoreszenz, CD11C-PE PVC 60min und CD11C-PE PVC 120min** sind normalverteilt.

T-Test für unverbundene Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 60 min $p=0,55$, Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,66$, Leerwert gegen PVC 60min $p=0,27$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,23$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p=0,32$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,27$. **Es finden sich keine signifikanten Unterschiede.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	11C NS	11C Leerw.	11C Hep. 60min	11C PVC 60min	11C Hep. 120min	11C PVC 120min
Auto	0,1223	----	-8,100e-03	-3,2450	-4,235	-4,896*	-3,9565	-5,2643*
11C NS	0,1304	Nein (p=1,0)	----	-3,2374	-4,2270	-4,88790*	-3,94840	-5,25620*
11C Leerw.	3,3678	Nein (p=0,476)	Nein (p=0,483)	----	-0,9860	-1,65050	-0,71100	-2,0188
11C Hep. 60min	4,3574	Nein (p=0,071)	Nein (p=0,072)	Nein (p=1,0)	----	-0,6609	0,2786	-1,0292
11C PVC 60min	12,7043	Nein (p=0,017)	Nein (p=0,017)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-0,9395	-0,3683
11C Hep. 120min	4,0788	Nein (p=0,125)	Nein (p=0,127)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-1,3078
11C PVC 120min	12,1186	Nein (p=0,007)	Nein (p=0,007)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----



Grafik 3.5 : MW und SF der CD11c –Messung in der Lymphozytenpopulation. Ansteigende MFI zwischen Leerwert und PVC 60/120min, sehr schwacher Anstieg der MFI für heparinbeschichtetes PVC 60/120min geg. Leerwert.

Monozyten

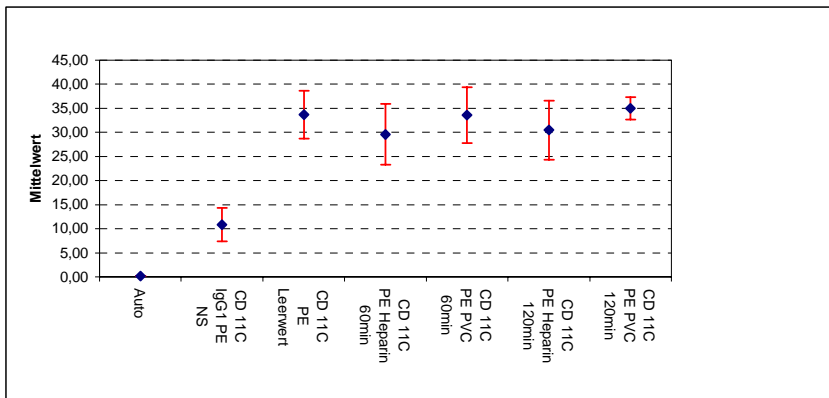
	Auto	CD 11C IgG1 PE NS	CD 11C PE Leerwert	CD 11C PE Heparin 60min	CD 11C PE PVC 60min	CD 11C PE Heparin 120min	CD 11C PE PVC 120min
gültige Fälle	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Mittelwert	0,181	10,842	33,660	29,600	33,630	30,482	34,986
Std.Fehler des MW	0,008	3,443	4,977	6,279	5,802	6,141	2,299
Varianz	0,001	118,546	247,689	394,278	336,642	377,092	52,851
Std.Abweichung	0,024	10,888	15,738	19,856	18,348	19,419	7,270
Variationskoeffizient	0,133	1,004	0,468	0,671	0,546	0,637	0,208
Median	0,169	6,810	28,800	19,350	24,600	22,450	32,900
geom. Mittelwert	0,180	4,117	31,190	25,551	29,949	24,679	34,317

1 Ausreißer im Datenbestand CD11C-PE Leerwert (Wert 74,1). Alle Werte sind normalverteilt.

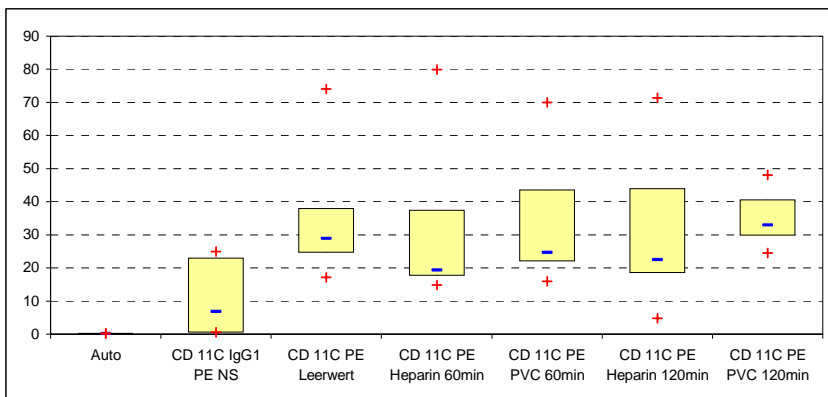
T-Test für unverbundene Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 60 min $p=0,61$, Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,69$, Leerwert gegen PVC 60min $p=0,99$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,811$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p=0,64$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,50$. **Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	11C NS	11C Leerw.	11C Hep. 60min	11C PVC 60min	11C Hep. 120min	11C PVC 120min
Auto	0,008	----	-10,6613	-33,478*	-29,419*	-33,449*	-30,266*	-34,805*
11C NS	3,443	Ja ($p<0,001$)	----	-22,818*	-18,7576	-22,7876*	-19,604	-24,1436*
11C Leerw.	4,977	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,021$)	----	4,060	3e-02	3,213	-1,3260
11C Hep. 60min	6,297	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=0,128$)	Nein ($p=1,0$)	----	-4,0300	-0,8470	-5,3860
11C PVC 60min	5,802	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,021$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	----	3,1830	-1,3560
11C Hep. 120min	6,141	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=0,90$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	----	-4,539
11C PVC 120min	2,299	Ja ($p<0,001$)	ja ($p=0,011$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	----



Grafik 3.6 : MW und SF der CD11C –Messung in der Monozytenpopulation. Wenig Abfall der MFI in der heparinbeschichteten PVC -Loops, schwache Zunahme der MFI in den PVC-Loops gegenüber dem Leerwert.



Grafik 3.7 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der CD11C –Messung in der Monozytenpopulation. Wenig Abfall der MFI in den heparinbeschichteten PVC -Loops, schwache Zunahme der MFI in den PVC-Loops gegenüber dem Leerwert.

Granulozyten

	Auto	CD 11C IgG1 PE NS	CD 11C PE Leerwert	CD 11C PE Heparin 60min	CD 11C PE PVC 60min	CD 11C PE Heparin 120min	CD 11C PE PVC 120min
gültige Fälle	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Mittelwert	0,197	0,663	19,426	13,589	22,310	9,904	19,370
Std.Fehler des MW	0,011	0,016	5,685	4,711	5,611	2,128	3,268
Varianz	0,001	0,003	323,139	221,965	314,841	45,303	106,818
Std.Abweichung	0,036	0,051	17,976	14,898	17,744	6,731	10,335
Variationskoeffizient	0,181	0,077	0,925	1,096	0,795	0,680	0,534
Median	0,206	0,653	11,800	6,405	14,600	6,090	16,750
geom. Mittelwert	0,193	0,661	14,996	8,835	18,024	8,056	17,889

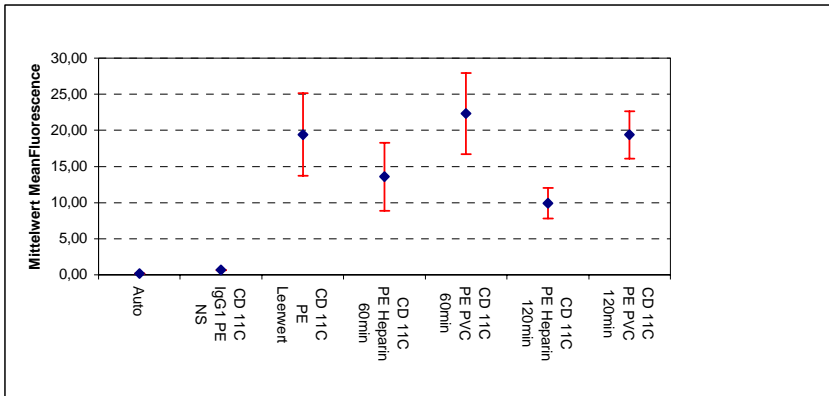
Ausreißer im Datenbestand : CD11B-PE Leerwert (Wert 67,3) und CD11C-PE PVC 120min (Wert 48,1). Alle Werte sind normalverteilt.

T-Test für unverbundene Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 60 min $p=0,439$, Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,134$, Leerwert gegen PVC 60min $p=0,722$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,993$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p=0,249$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,0259$. **Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen heparinbeschichtetem PVC 120min und PVC 120min.**

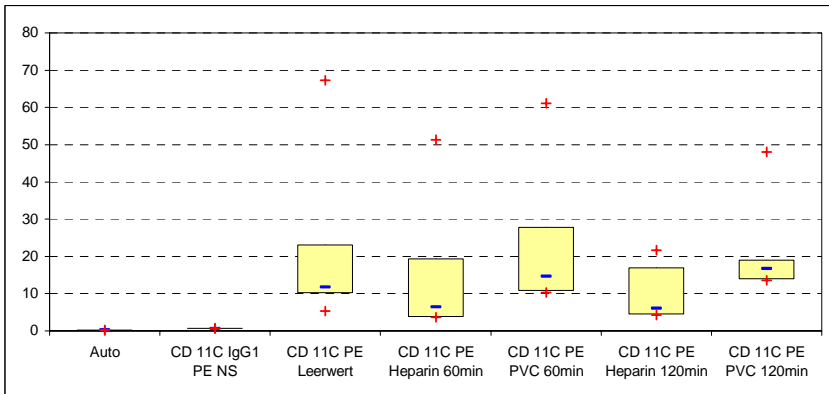
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	11C NS	11C Leerw.	11C Hep. 60min	11C PVC 60min	11C Hep. 120min	11C PVC 120min
Auto	0,197	----	-0,464	-19,229*	-13,392*	-22,1133*	-9,707	-19,17*
11C NS	0,663	nein ($p=1,0$)	----	-18,7619*	-12,925*	-21,646*	-9,2399	-18,7059*

11C Leerw.	19,426	ja (p=0,014)		----	5,837	-2,884	9,522	5,6e-02
11C Hep. 60min	13,589	Nein (p=0,324)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-8,7210	3,685	-5,7810
11C PVC 60min	22,310	Ja (p=0,002)	Ja (p=0,003)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	12,406	2,940
11C Hep. 120min	9,904	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=0,511)	Nein (p=0,511)	----	-9,466
11C PVC 120min	19,370	Ja (p=0,015)	Nein (p=0,019)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----



Grafik 3.8 : MW und SF der CD11C –Messung in der Granulozytenpopulation. Abfall der MFI in den heparinbeschichteten PVC -Loops, Zunahme der MFI in den PVC-Loops gegenüber dem Leerwert.



Grafik 3.9 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der CD11C –Messung in der Granulozytenpopulation. Abfall der MFI in den heparinbeschichteten PVC -Loops, Zunahme der MFI in den PVC-Loops gegenüber dem Leerwert.

3.2.1.4 CD 18

Lymphozyten

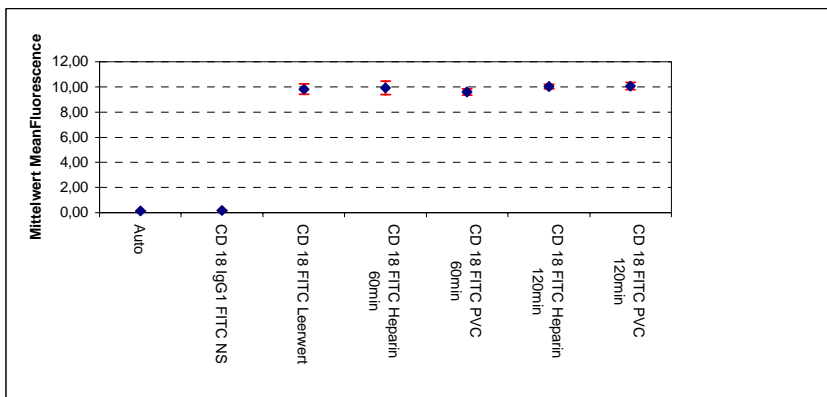
	Auto	CD 18 IgG1 FITC NS	CD 18 FITC Leerwert	CD 18 FITC Heparin 60min	CD 18 FITC PVC 60min	CD 18 FITC Heparin 120min	CD 18 FITC PVC 120min
gültige Fälle	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Mittelwert	0,141	0,163	9,827	9,924	9,610	10,034	10,071
Std.Fehler des MW	0,010	0,012	0,408	0,525	0,259	0,188	0,282
Varianz	0,001	0,001	1,666	2,756	0,668	0,355	0,793
Std.Abweichung	0,032	0,039	1,291	1,660	0,818	0,596	0,891
Variationskoeffizient	0,230	0,237	0,131	0,167	0,085	0,059	0,088
Median	0,125	0,141	10,300	9,985	9,765	9,955	9,810
geom. Mittelwert	0,138	0,159	9,736	9,781	9,578	10,018	10,037

Es finden sich keine Ausreißer. Alle Werte sind normalverteilt.

T-Test für unverbundene Stichproben : Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 60 min $p=0,886$, Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,651$, Leerwert gegen PVC 60min $p=0,659$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,629$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p=0,598$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,914$. **Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	CD18 NS	CD18 Leerw.	CD18 Hep. 60min	CD18 PVC 60min	CD18 Hep. 120min	CD18 PVC 120min
Auto	0,141	----	2,19e-02	-9,6864*	-9,7834*	-9,4690*	-9,893*	-9,930*
CD18 NS	0,163	Nein ($p=1,0$)	----	-9,6645*	-9,7615*	-9,4475*	-9,8715*	-9,90850*
CD18 Leerw.	9,827	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	-9,70e-02	0,2170	-0,207	-0,2440
CD18 Hep. 60min	9,924	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	----	0,31400	0,1100	0,1470
CD 18 PVC 60min	9,610	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	----	0,4240	0,46100
CD18 Hep. 120min	10,034	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	----	-3,7e-02
CD 18 PVC 120min	10,071	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	----



Grafik 3.10 : MW und SF der CD18 –Messung in der Lymphozytenpopulation. Anstiege der MFI in den Loops gegenüber Autofl. / NS.

Monozyten

	Auto	CD 18 IgG1 FITC NS	CD 18 FITC Leerwert	CD 18 FITC Heparin 60min	CD 18 FITC PVC 60min	CD 18 FITC Heparin 120min	CD 18 FITC PVC 120min
gültige Fälle	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Mittelwert	0,371	0,749	51,001	46,031	44,390	45,971	57,082
Std.Fehler des MW	0,014	0,042	6,737	6,913	8,023	8,360	7,152
Varianz	0,002	0,017	453,883	477,869	643,664	698,898	511,501
Std.Abweichung	0,044	0,132	21,305	21,860	25,371	26,437	22,616
Variationskoeffizient	0,120	0,176	0,418	0,475	0,572	0,575	0,396
Median	0,367	0,729	51,400	43,200	47,950	44,300	64,000
geom. Mittelwert	0,368	0,738	38,279	33,230	27,465	31,755	47,279

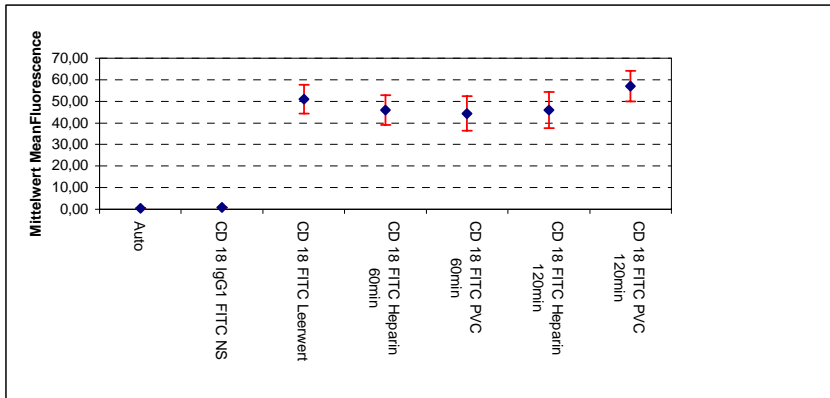
Es finden sich keine Ausreißer. Alle Werte sind normalverteilt.

T-Test für unverbundene Stichproben : Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 60 min $p=0,61$, Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,645$, Leerwert gegen PVC 60min $p=0,535$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,544$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p=0,879$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,3259$. **Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	CD18 NS	CD18 Leerw.	CD18 Hep. 60min	CD18 PVC 60min	CD18 Hep. 120min	CD18 PVC 120min
Auto	0,371	----	-0,3854	-50,637*	-45,647*	-44,026*	-45,607*	-56,718*
CD18 NS	0,749	Nein ($p=1,0$)	----	-50,252*	-45,262*	-43,641*	-45,222*	-56,333*
CD18 Leerw.	51,001	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	4,990	6,6107	5,030	-6,081
CD18Hep. 60min	46,0,31	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	----	1,6207	4e-02	-11,0770

CD 18 PVC 60min	44,390	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-1,5807	-12,6917
CD18 Hep. 120min	45,971	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-11,111
CD 18 PVC 120min	57,082	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----



Grafik 3.11 : MW und SF der CD18 –Messung in der Monozytenpopulation. Insgesamt wenig Änderung der MFI außer gegenüber Autofl. und NS. Leichte Zunahme bei 120min-PVC gegenüber dem Leerwert.

Granulozyten – Final-Versuch

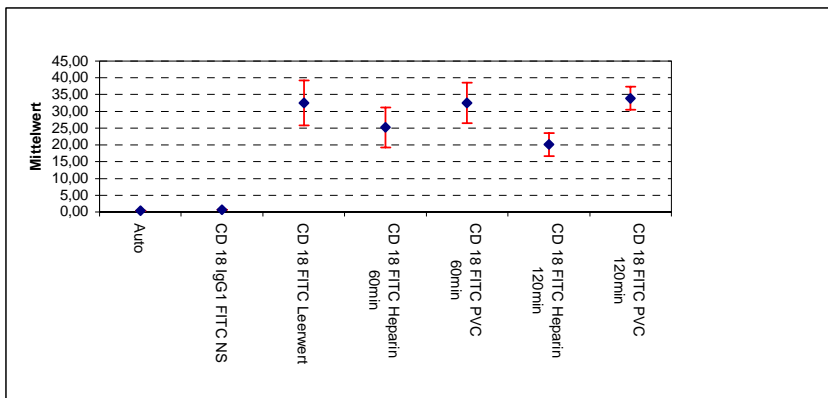
	Auto	CD 18 IgG1 FITC NS	CD 18 FITC Leerwert	CD 18 FITC Heparin 60min	CD 18 FITC PVC 60min	CD 18 FITC Heparin 120min	CD 18 FITC PVC 120min
gültige Fälle	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Mittelwert	0,363	0,711	32,470	25,188	32,494	20,112	33,912
Std.Fehler des MW	0,017	0,023	6,719	6,015	5,995	3,418	3,426
Varianz	0,003	0,005	451,482	361,842	359,379	116,841	117,353
Std.Abweichung	0,052	0,074	21,248	19,022	18,957	10,809	10,833
Variationskoeffizient	0,144	0,104	0,654	0,755	0,583	0,537	0,319
Median	0,374	0,702	23,350	15,400	31,500	15,600	35,200
geom. Mittelwert	0,358	0,707	25,782	19,889	24,671	17,929	30,013

Es finden Ausreißer in der Autofluoreszenz (Wert 0,221) und in CD18-FITC PVC 120min (Wert 4,52). Alle Werte sind normalverteilt, **CD18FITC PVC120min grenzwertig normalverteilt (p=0,7329)**

T-Test für unverbundene Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 60 min p=0,4299, Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min p=0,1185, Leerwert gegen PVC 60min p=0,9979, Leerwert gegen PVC 120min p=0,85, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min p=0,400, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min p=0,01059. **Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen heparinbeschichtetem PVC 120min und PVC 120min.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	CD18 NS	CD18 Leerw.	CD18 Hep. 60min	CD18 PVC 60min	CD18 Hep. 120min	CD18 PVC 120min
Auto	0,363	----	-0,34810	-32,1073*	-24,8253*	-29,2213*	-19,7493*	-33,5493*
CD18 NS	0,711	Nein (p=1,0)	----	-31,759*	-24,4772*	-28,8732*	-19,401	-33,2012*
CD18 Leerw.	32,47	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----	7,282	2,8860	12,3570	-1,442
CD18Hep. 60min	25,188	Ja (p=0,007)	Ja (p=0,008)	Nein (p=1,0)	----	-4,396	5,0760	-8,7240
CD 18 PVC 60min	32,494	Ja (p=0,001)	Ja (p=0,001)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	9,4720	-4,3280
CD18 Hep. 120min	20,112	Nein (p=0,074)	Nein (p=0,086)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-13,800
CD 18 PVC 120min	33,912	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=0,797)	Nein (p=0,797)	----



Grafik 3.12 : MW und SF der CD18 –Messung in der Granulozytenpopulation. Abnahmen der MFI in den heparinbeschichteten PVC -Loops gegenüber dem Leerwert, Zunahme der MFI in den PVC-Loops gegenüber dem Leerwert.

3.2.1.5 CD 62L

Lymphozyten

	Auto	CD 62L FITC IgG2a NA	CD 62L FITC Leerwert	CD 62L FITC Heparin 60min	CD 62L FITC PVC 60min	CD 62L FITC Heparin 120min	CD 62L FITC PVC 120min
gültige Fälle	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Mittelwert	0,141	0,174	9,985	10,408	10,105	11,078	11,405
Std.Fehler des MW	0,010	0,015	0,539	0,561	0,496	0,448	0,387
Varianz	0,001	0,002	2,905	3,147	2,465	2,005	1,498
Std.Abweichung	0,032	0,047	1,704	1,774	1,570	1,416	1,224
Variationskoeffizient	0,230	0,273	0,171	0,170	0,155	0,128	0,107

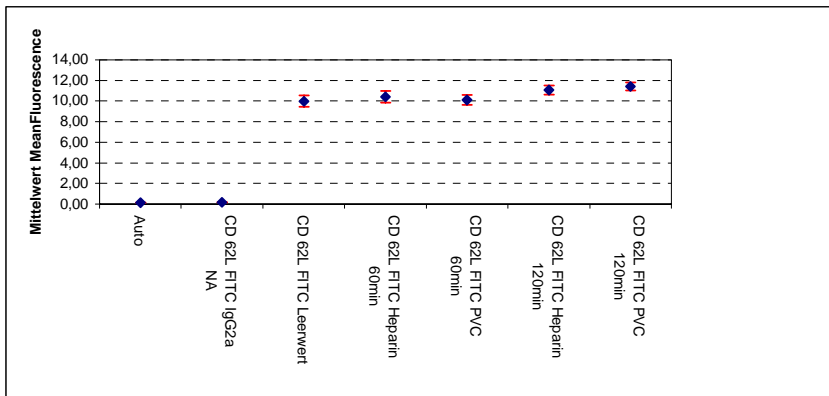
Median	0,125	0,149	9,485	9,950	9,895	11,550	12,000
geom. Mittelwert	0,138	0,169	9,864	10,279	10,000	10,992	11,341

Es finden sich keine Ausreißer. Alle Werte sind normalverteilt.

T-Test für unverbundene Stichproben : Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 60 min $p=0,593$, Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,136$, Leerwert gegen PVC 60min $p=0,87$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,046$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p=0,69$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,587$. **Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen dem Leerwert und PVC 120min.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	CD62L NS	CD62L Leerw.	CD62L Hep. 60min	CD62L PVC 60min	CD62L Hep. 120min	CD62L PVC 120min
Auto	0,141	----	3,33e-02	-9,84440*	-10,2674*	-9,76440*	-10,937*	-11,2644*
CD62L NS	0,174	Nein ($p=1,0$)	----	-9,8111*	-10,2341*	-9,7311*	-10,9041*	-11,2311*
CD62L Leerw.	9,985	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	-0,4230	8e-02	-1,0930	-1,4200
CD18Hep. 60min	10,408	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	----	0,5030	-0,6700	-0,9970
CD 62L PVC 60min	10,105	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	----	-1,1730	-1,500
CD62L Hep. 120min	11,078	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	----	-0,32700
CD62L PVC 120min	11,405	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=0,512$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=0,371$)	Nein ($p=1,0$)	----



Grafik 3.13 : MW und SF der CD62L –Messung in der Lymphozytenpopulation. Geringe Änderungen der MFI, außer zwischen Autofl. / NS und dem Leerwert / Loops.

Monozyten

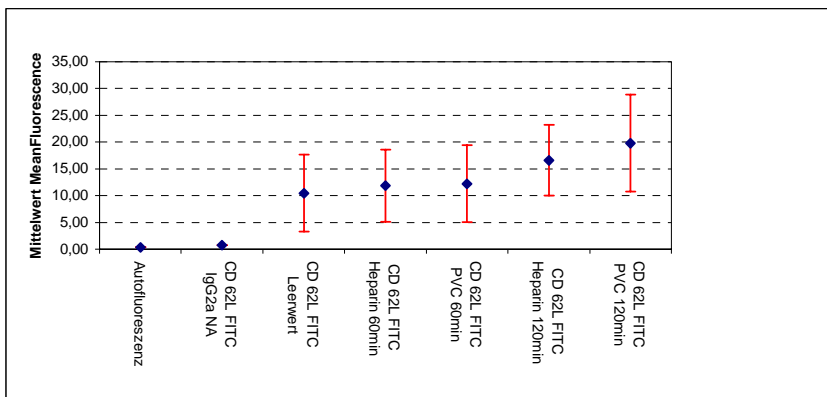
	Autofluoreszenz	CD 62L FITC IgG2a NA	CD 62L FITC Leerwert	CD 62L FITC Heparin 60min	CD 62L FITC PVC 60min	CD 62L FITC Heparin 120min	CD 62L FITC PVC 120min
gültige Fälle	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Mittelwert	0,364	0,762	10,461	11,855	12,230	16,605	19,795
Std.Fehler des MW	0,019	0,031	7,186	6,728	7,199	6,623	9,022
Varianz	0,004	0,009	516,439	452,660	518,191	438,697	813,891
Std.Abweichung	0,060	0,097	22,725	21,276	22,764	20,945	28,529
Variationskoeffizient	0,165	0,127	2,172	1,795	1,861	1,261	1,441
Median	0,367	0,729	1,395	6,625	4,615	13,000	8,220
geom. Mittelwert	0,359	0,757	2,845	4,521	4,565	8,796	8,652

Ausreißer werden in folgenden Werten gefunden: CD62L-FITC Leerwert (Wert 74,1), CD62L-FITC heparinbeschichtetes PVC 60min (Wert 71,3), CD62L-FITC PVC 60min (Wert 75,9), CD62L-FITC heparinbeschichtetes PVC 120min (Wert 74).. Alle Werte sind **grenzwertig normalverteilt (p=0,06 bis p=0,88)**

T-Test für unverbundene Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 60 min p=0,89, Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min p=0,54, Leerwert gegen PVC 60min p=0,86, Leerwert gegen PVC 120min p=0,43, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min p=0,97, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min p=0,78. **Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze p=0,05 (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	CD62L NS	CD62L Leerw.	CD62L Hep. 60min	CD62L PVC 60min	CD62L Hep. 120min	CD62L PVC 120min
Auto	0,364	----	-0,39810	-10,0975	-11,49150	-11,8654	-16,2418	-19,431
CD62L NS	0,762	Nein (p=1,0)	----	-9,6994	-11,0934	-11,4673	-15,843	-19,0333
CD62L Leerw.	10,461	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-1,3940	-1,7679	-6,1440	-9,3339
CD18Hep. 60min	11,855	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-0,3739	-4,75030	-7,9399
CD 62L PVC 60min	12,230	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-4,3764	-7,5660
CD62L Hep. 120min	16,605	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-3,1896
CD62L PVC 120min	19,749	Nein (p=0,667)	Nein (p=0,741)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----



Grafik 3.14 : MW und SF der CD62L –Messung in der Monozytenpopulation. Ansteigende MFI in den Loops gegenüber dem Leerwert. Stärkere Ausprägung bei den 120min-Werten (Heparin < PVC)

Granulozyten

	Autofluoreszenz	CD 62L FITC IgG2a NA	CD 62L FITC Leerwert	CD 62L FITC Heparin 60min	CD 62L FITC PVC 60min	CD 62L FITC Heparin 120min	CD 62L FITC PVC 120min
gültige Fälle	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Mittelwert	0,363	0,663	15,964	16,667	12,345	14,343	9,017
Std.Fehler des MW	0,017	0,019	5,131	4,400	5,579	2,420	3,661
Varianz	0,003	0,004	263,260	193,560	311,208	58,570	134,014
Std.Abweichung	0,052	0,062	16,225	13,913	17,641	7,653	11,576
Variationskoeffizient	0,144	0,093	1,016	0,835	1,429	0,534	1,284
Median	0,374	0,662	12,650	15,150	8,805	15,150	6,145
geom. Mittelwert	0,358	0,661	11,834	13,383	6,091	9,458	5,316

Ausreißer werden in folgenden Werten gefunden: Autofluoreszenz (Wert 0,221), CD62L-FITC Leerwert (Wert 60,2), CD62L-FITC heparinbeschichtetes PVC 60min (Wert 54), CD62L-FITC PVC 60min (Wert 61,7), CD62L-FITC PVC 120min (Wert 41,4).

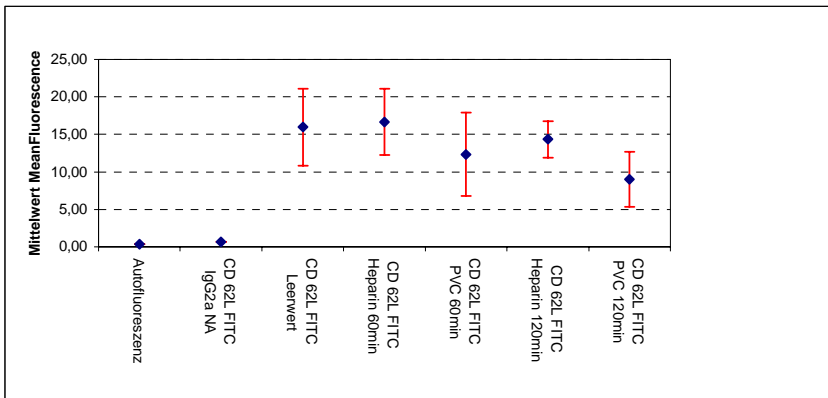
Es besteht keine Normalverteilung in Autofluoreszenz, CD62L FITC heparinbeschichtetes PVC 60min und CD62L FITC PVC 120min.

T-Test für unverbundene Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 60 min $p=0,9183$, Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,78$, Leerwert gegen PVC 60min $p=0,64$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,28$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p=0,55$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,24$. **Es bestehen keine signifikanten Unterschiede**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	CD62L NS	CD62L Leerw.	CD62L Hep.	CD62L PVC	CD62L Hep.	CD62L PVC

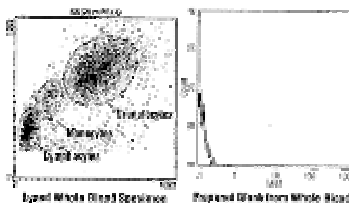
					60min	60min	120min	120min
Auto	0,363	----	-0,2978	-15,598	-16,30151	-11,97961	-13,977	-8,6511
CD62L NS	0,663	Nein (p=1,0)	----	-15,300	-16,003	-11,6810	-13,67920	-8,3538
CD62L Leerw.	15,964	Nein (p=0,087)	Nein (p=0,087)	----	-0,7030	3,6189	1,6215	6,9469
CD18Hep. 60min	16,667	Nein (p=0,059)	Nein (p=0,102)	Nein (p=1,0)	----	4,3219	2,3245	7,6499
CD 62L PVC 60min	12,345	Nein (p=0,537)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-1,99740	3,3280
CD62L Hep. 120min	14,343	Nein (p=0,204)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	5,32540
CD62L PVC 120min	9,017	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----



Grafik 3.15 : MW und SF der CD62L –Messung in der Granulozytenpopulation. Abfallende CD62L-MFI gegenüber dem Leerwert mit stärkerer Ausprägung bei den 120min-Werten (PVC > heparinbeschichtetes PVC).

3.2.2 CellProbe

3.2.2.1 Leerwerte und Negative Staining / Kallibrierung



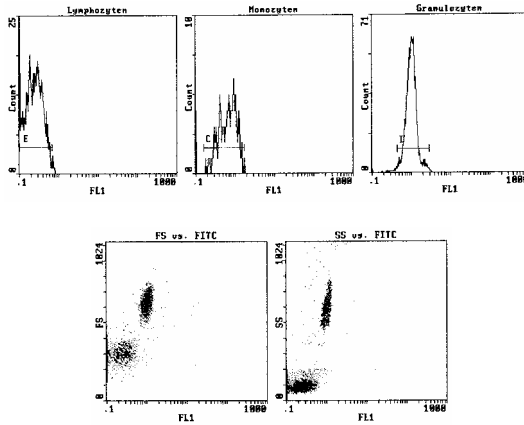
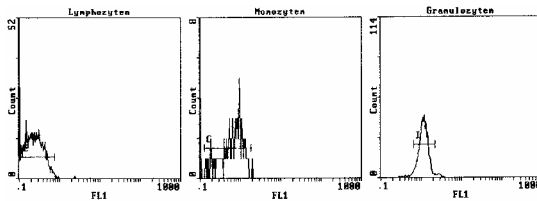


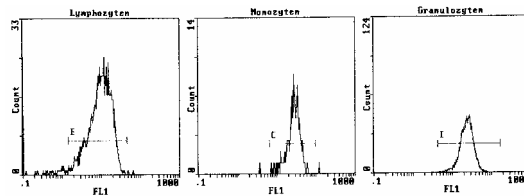
Abb. 3.14 : Gating der Leukozytenpopulationen und Messung der Autofluoreszenz.

3.2.2.2 Oxidativer Burst

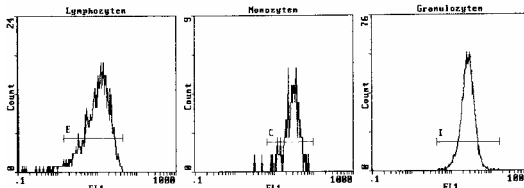
3.2.2.2.1 Ergebnisse optisch



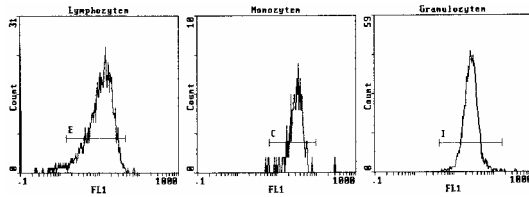
Blank-Probe = Autofluoreszenz



Kein Schlauchkontakt = Leerwert = „0“



PVC-Kontakt mit 120min Rotationsdauer



Kontakt mit heparinbeschichtetem Schlauch über 120min Rotationsdauer

Abb. 3.15 : Darstellung der Histogramme nach Messung von 10.000 Zellen pro Versuchsansatz (0=Leerwert, H = heparinbeschichteter Schlauch, P = PVC-Schlauch). Die MeanFluorescence mit ihren charakteristischen Peaks verschiebt sich zu ungunsten des PVC-Schlauchs und signalisiert eine verstärkte Aktivität des oxidativen Burst.

3.2.2.2 Ergebnisse Oxidativer Burst

Lymphozyten

	blank Oxidativer Burst Lymphozyten	0 Oxidativer Burst Lymphozyten	H Oxidativer Burst Lymphozyten	P Oxidativer Burst Lymphozyten
gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,135	4,143	6,149	6,491
Std.Fehler des MW	0,036	0,144	0,736	0,147
Varianz	0,010	0,166	4,330	0,174
Std.Abweichung	0,102	0,408	2,081	0,417
Variationskoeffizient	0,756	0,098	0,338	0,064
Median	0,148	4,275	4,935	6,375
geom. Mittelwert	----	4,124	5,860	6,480

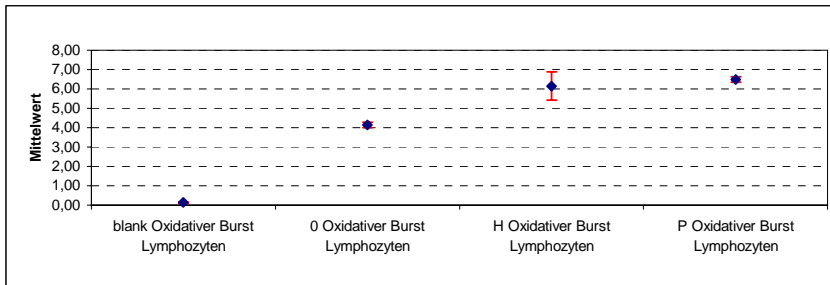
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,180$, Leerwert gegen PVC 120min $p<0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,655$. **Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen dem Leerwert und heparinbeschichtetem PVC 120min-Werten, sowie ein hochsignifikanter Unterschied zw. dem Leerwert und PVC 120min.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank Oxidativer Burst Lymphozyten	0 Oxidativer Burst Lymphozyten	H Oxidativer Burst Lymphozyten	P Oxidativer Burst Lymphozyten
blank Ox. Burst	0,13475	----	-4,0075*	-6,0138*	-6,3438*
0 Ox. Burst	4,1425	Ja ($p<0,001$)	----	-2,0062*	-2,3363*
H Ox. Burst	6,14875	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,005$)	----	-0,3300
P Ox. Burst	6,49125	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,01$)	Nein ($p=1,0$)	----

Die ANOVA zeigt hochsignifikante Mittelwertunterschiede bei allen Vergleichen, außer zwischen PVC120min und heparinbeschichtetem PVC 120min.



Grafik 3.16 MW und SF des oxidativen Burst im Lymphozytengate

Monozyten

	blank Oxidativer Burst Monozyten	0 Oxidativer Burst Monozyten	H Oxidativer Burst Monozyten	P Oxidativer Burst Monozyten
gültige Fälle	8	8	8	8
Mittelwert	0,106125	27,3	40,5475	41,1875
Std.Fehler des MW	0,0475888	1,389629961	2,089439219	0,406969418
Varianz	0,01811755	15,44857143	34,92605	1,324992857
Std.Abweichung	0,13460146	3,930467075	5,909826563	1,151083341
Variationskoeffizient	1,26832944	0,143973153	0,145750701	0,027947395
Median	0,0515	28,25	41,55	41,2
geom. Mittelwert	----	27,03505567	40,15898103	41,17348745

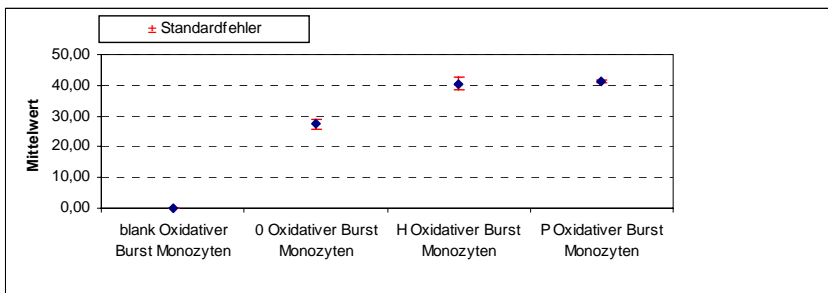
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p = 0,768$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede zwischen dem Leerwert und beiden 120min-Werten.**

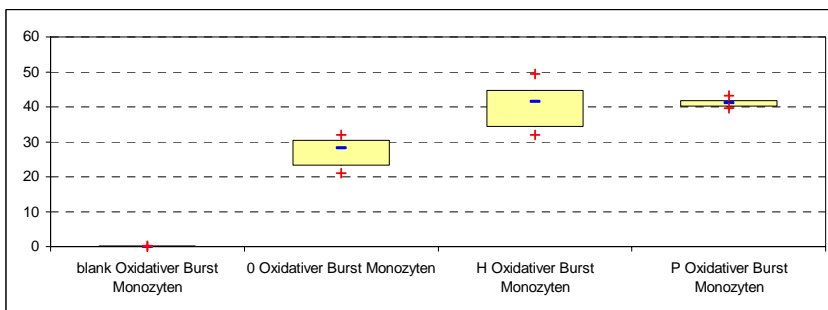
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank Ox. Burst Monozyten	0 Ox. Burst Monozyten	H Ox. Burst Monozyten	P Ox. Burst Monozyten
blank Ox. Burst	0,106125	----	-27,1950*	-40,4425*	-41,0825*
0 Ox. Burst	27,3	Ja ($p < 0,001$)	----	-13,2475*	-13,8875
H Ox. Burst	40,5475	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-0,6400
P Ox. Burst	41,1875	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Nein ($p = 1,0$)	----

Die ANOVA zeigt hochsignifikante Mittelwertunterschiede bei allen Vergleichen, außer zwischen PVC120min und heparinbeschichtetem PVC 120min.



Grafik 3.17 : MW und SF des oxidativen Bursts der Monozytenpopulation.



Grafik 3.18 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des oxidativen Bursts der Monozytenpopulation.

Granulozyten

	blank Oxidativer Burst	0 Oxidativer Burst	H Oxidativer Burst	P Oxidativer Burst
gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,314	114,475	142,434	170,567
Std.Fehler des MW	0,072	4,961	11,353	2,509
Varianz	0,042	196,911	1031,082	50,378
Std.Abweichung	0,204	14,032	32,110	7,098
Variationskoeffizient	0,650	0,123	0,225	0,042
Median	0,264	114,150	128,552	171,040
geom. Mittelwert	0,258	113,734	139,822	170,437

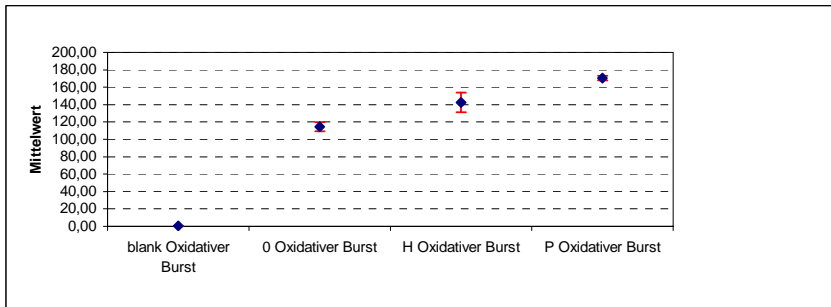
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,041$, Leerwert gegen PVC 120min $p<0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,029$. **Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen dem Leerwert und heparinbeschichtetem PVC 120min, ebenso zwischen dem Leerwert und PVC 120min, weiterhin findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Schlauchtypen zum Zeitpunkt 120min.**

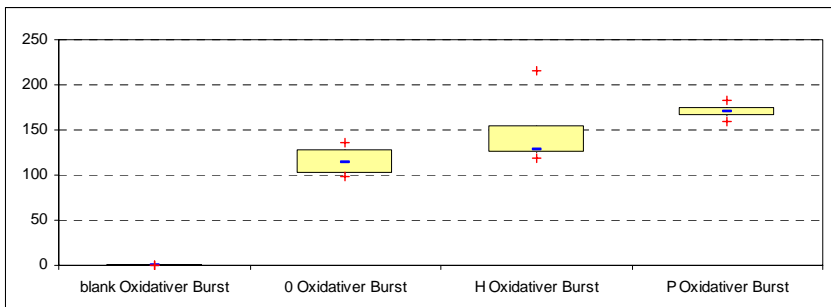
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank Oxidativer Burst	0 Oxidativer Burst	H Oxidativer Burst	P Oxidativer Burst
blank Ox. Burst	0,313875	----	-114,1612*	-142,12*	-170,2512*
0 Ox. Burst	114,475	Ja ($p<0,001$)	----	-27,9587*	-56,09*
H Ox. Burst	142,434175	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,025$)	----	-28,1312*
P Ox. Burst	170,5665	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,023$)	----

Die ANOVA zeigt hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.



Grafik 3.19 : MW und SF des oxidativen Burst der Granulozytenpopulation



Grafik 3.20 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des oxidativen Burst der Granulozytenpopulation

3.2.2.2.3 Oxidativer Burst mit PMA-Nachaktivierung

Lymphozyten

	blank PMA Oxidativer Burst	0 PMA Oxidativer Burst	H PMA Oxidativer Burst	P PMA Oxidativer Burst
gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,221	5,118	12,113	16,123

Std.Fehler des MW	0,102	0,806	0,203	0,148
Varianz	0,083	5,201	0,328	0,176
Std.Abweichung	0,288	2,281	0,573	0,419
Variationskoeffizient	1,302	0,446	0,047	0,026
Median	0,112	5,915	12,130	16,210
geom. Mittelwert	----	4,139	12,101	16,118

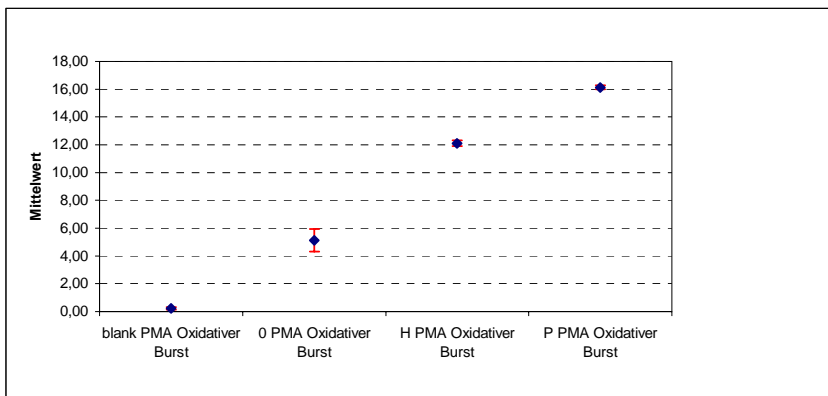
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,033$, Leerwert gegen PVC 120min $p<0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p<0,001$. **Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen dem Leerwert und heparinbeschichtetem PVC 120min, sowie hochsignifikante Unterschiede zw. dem Leerwert und PVC 120min und zw. beiden 120min-Werten**

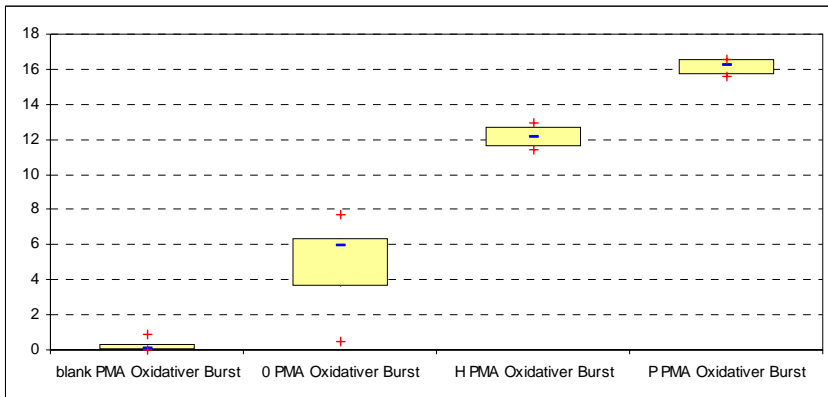
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank PMA Oxidativer Burst	0 PMA Oxidativer Burst	H PMA Oxidativer Burst	P PMA Oxidativer Burst
blank PMA Ox. Burst	0,221375	----	-4,8962*	-11,8913*	-15,9013
0 PMA Ox. Burst	5,1175	Ja ($p<0,001$)	----	-6,9950*	-11,0050*
H PMA Ox. Burst	12,1125	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	-4,0100*
P PMA Ox. Burst	16,1225	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----

Die ANOVA zeigt hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.



Grafik 3.21: MW und SF des oxidativen Burst mit PMA-Nachaktivierung in der Lymphozytenpopulation.



Grafik 3.22 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des oxidativen Burst mit PMA-Nachaktivierung in der Lymphozytenpopulation.

Monozyten

	blank PMA Oxidativer Burst	0 PMA Oxidativer Burst	H PMA Oxidativer Burst	P PMA Oxidativer Burst
Gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,155	12,216	12,200	9,411
Std.Fehler des MW	0,065	1,825	1,967	1,240
Varianz	0,034	26,635	30,938	12,301
Std.Abweichung	0,184	5,161	5,562	3,507
Variationskoeffizient	1,189	0,422	0,456	0,373
Median	0,113	11,550	10,950	8,435
geom. Mittelwert	----	11,294	11,252	8,950

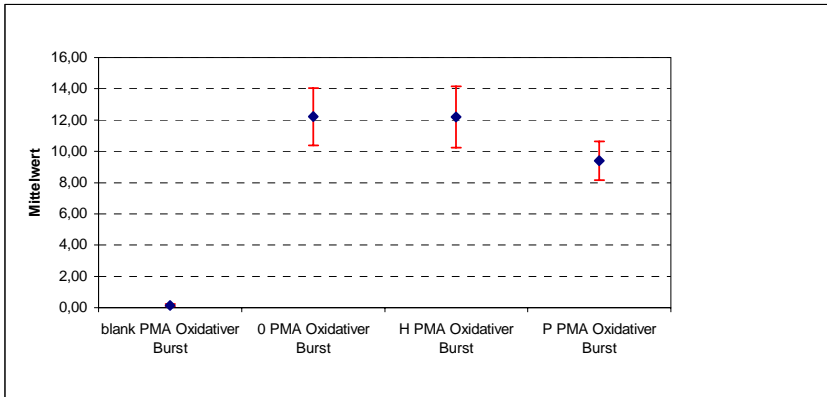
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,840$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,946$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,894$. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank PMA Ox. Burst	0 PMA Ox. Burst	H PMA Ox. Burst	P PMA Ox. Burst
blank PMA Ox. Burst	0,155	----	-12,0625*	-12,0462*	-9,2575*
0 PMA Ox. Burst	12,21625	Ja ($p<0,001$)	----	1,625E-02	2,8050
H PMA Ox. Burst	12,2	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	----	2,7887
P PMA Ox. Burst	9,1411	Ja ($p=0,001$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	----

Die ANOVA zeigt hochsignifikante zwischen der Autofluoreszenz und Leerwert, Heparinbeschichtung und PVC-Schlauch.



Grafik 3.23 : MS und SF des oxidativen Burst mit PMA-Nachaktivierung in der Monozytenpopulation

Granulozyten

	blank PMA Oxidativer Burst	0 PMA Oxidativer Burst	H PMA Oxidativer Burst	P PMA Oxidativer Burst
gültige Fälle	8,00	8,00	8,00	8,00
Mittelwert	0,37	37,28	50,34	83,79
Std.Fehler des MW	0,21	3,91	5,28	3,24
Varianz	0,36	122,39	223,16	83,74
Std.Abweichung	0,60	11,06	14,94	9,15
Variationskoeffizient	1,65	0,30	0,30	0,11
Median	0,10	38,60	50,75	87,27
geom. Mittelwert	----	35,23	48,24	83,32

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

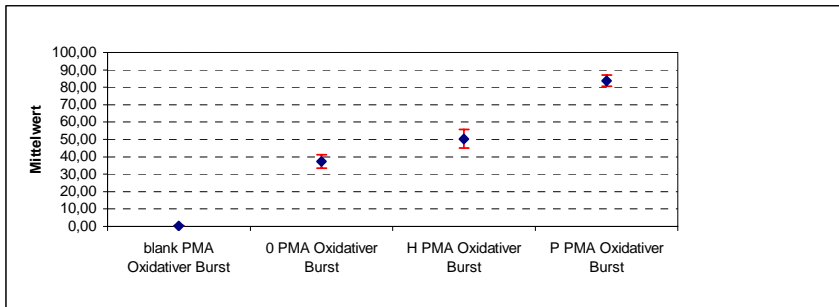
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,01$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,01$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,01$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede in allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

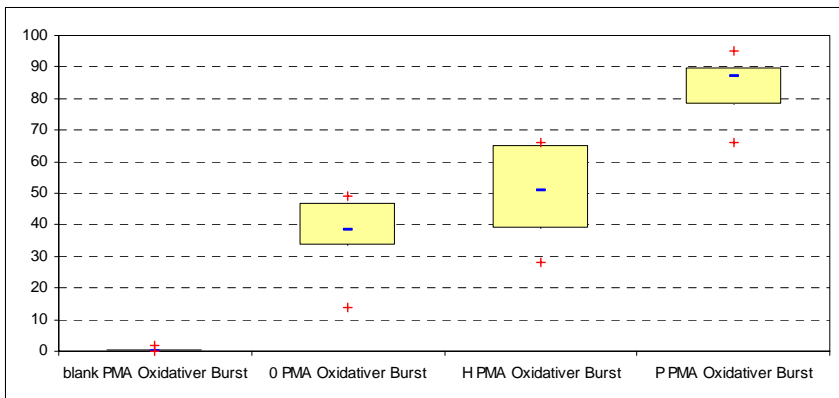
	(Mittelwert)	blank PMA Ox. Burst	0 PMA Ox. Burst	H PMA Ox. Burst	P PMA Ox. Burst
blank PMA Ox. Burst	0,366	----	-36,9100*	-49,9775*	-83,4275*
0 PMA Ox. Burst	37,275	Ja ($p < 0,001$)	----	-13,0675	-46,5175*
H PMA Ox. Burst	50,3425	Ja ($p < 0,001$)	Nein ($p = 0,106$)	----	-33,45*

P PMA Ox. Burst	83,7925	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----
------------------------	---------	-----------------	--------------	--------------	------

Die ANOVA zeigt hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen außer zwischen dem Leerwert und dem heparinbeschichteten Schlauch.



Grafik 3.24 : MW und SF des oxidativen Burst mit PMA-Nachaktivierung in der Granulozytenpopulation



Grafik 3.25 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des oxidativen Burst mit PMA-Nachaktivierung in der Granulozytenpopulation

3.2.2.2.4 Oxidativer Burst mit FMLP-Nachaktivierung

Lymphozyten

	blank FMLP Oxidativer Burst	0 FMLP Oxidativer Burst	H FMLP Oxidativer Burst	P FMLP Oxidativer Burst
gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,241	2,970	3,488	7,830
Std.Fehler des MW	0,101	0,155	0,155	0,093

Varianz	0,081	0,191	0,191	0,070
Std.Abweichung	0,285	0,437	0,437	0,264
Variationskoeffizient	1,180	0,147	0,125	0,034
Median	0,154	3,000	3,450	7,875
geom. Mittelwert	----	2,943	3,464	7,826

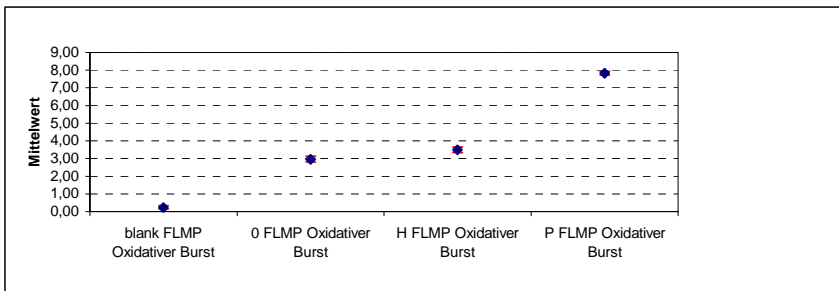
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen**

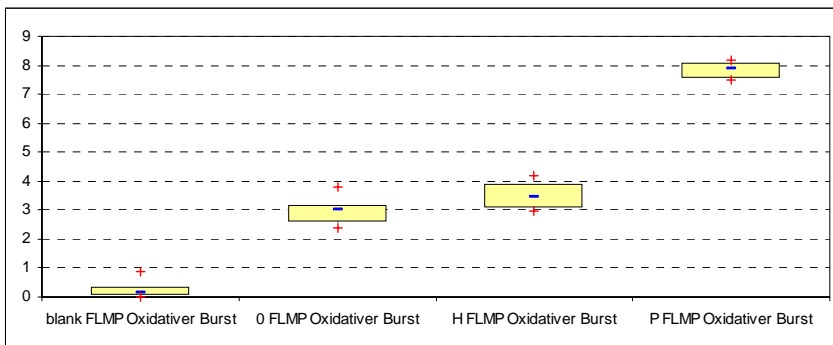
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank FMLP Ox. Burst	0 FMLP Ox. Burst	H FMLP Ox. Burst	P FMLP Ox. Burst
blank FMLP Ox. Burst	0,241125	----	-2,7275*	-3,2450*	-7,5875*
0 FMLP Ox. Burst	2,97	Ja ($p < 0,001$)	----	-0,5175	-4,86*
H FMLP Ox. Burst	3,4875	Ja ($p < 0,001$)	Nein ($p = 0,51$)	----	-4,3425*
P FMLP Ox. Burst	7,83	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----

Alle Vergleiche zeigen hochsignifikante Unterschiede mit Ausnahme des Vergleichs zwischen dem Leerwert und dem heparinbeschichteten Schlauch.



Grafik 3.26 : MW und SF des oxidativen Burst mit FMLP-Nachaktivierung in der Lymphozytenpopulation



Graphik 3.27 : Box&Whisker-Graphik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des oxidativen Burst mit FMLP-Nachaktivierung in der Lymphozytenpopulation

Monozyten

	blank FMLP Oxidativer Burst	0 FMLP Oxidativer Burst	H FMLP Oxidativer Burst	P FMLP Oxidativer Burst
Gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,193	18,513	17,204	18,021
Std.Fehler des MW	0,108	5,310	3,535	4,913
Varianz	0,093	225,593	99,948	193,115
Std.Abweichung	0,305	15,020	9,997	13,897
Variationskoeffizient	1,580	0,811	0,581	0,771
Median	0,112	11,500	16,500	13,000
geom. Mittelwert	----	13,031	14,431	13,063

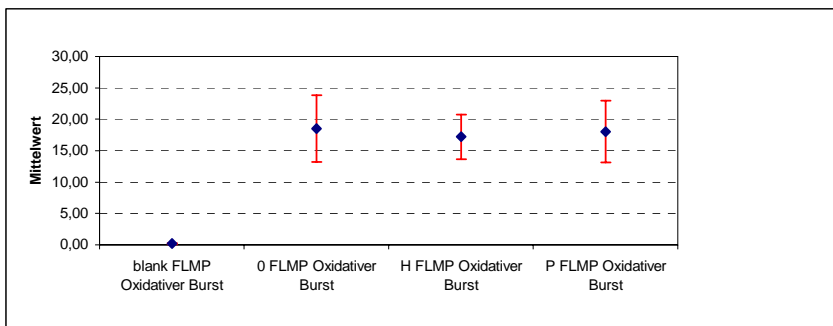
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,995$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,224$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,0250$. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank FMLP Ox. Burst	H FMLP Ox. Burst	P FMLP Ox. Burst	0 FMLP Ox. Burst
blank FMLP Ox. Burst	0,193	----	-18,32*	-17,0113*	-17,8288*
H FMLP Ox. Burst	17,20375	Ja ($p<0,001$)	----	1,3088	0,4913
P FMLP Ox. Burst	18,02125	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	----	-0,8175
0 FMLP Ox. Burst	18,5125	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	----

Außer zwischen Autofluoreszenz und allen anderen Bestimmungen lassen sich keine Unterschiede feststellen.



Grafik 3.28 : MW und SF des oxidativen Burst mit FMLP-Nachaktivierung in der Monozytenpopulation

Granulozyten

	blank FMLP Oxidativer Burst	0 FMLP Oxidativer Burst	H FMLP Oxidativer Burst	P FMLP Oxidativer Burst
gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,314	15,108	21,182	26,292
Std.Fehler des MW	0,092	0,535	0,240	0,863
Varianz	0,067	2,290	0,460	5,963
Std.Abweichung	0,259	1,513	0,678	2,442
Variationskoeffizient	0,826	0,100	0,032	0,093
Median	0,307	14,700	21,097	26,088
geom. Mittelwert	----	15,042	21,172	26,194

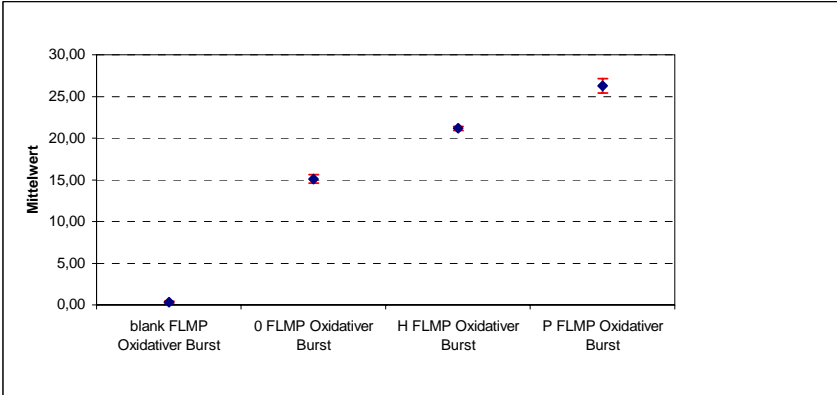
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,067$, Leerwert gegen PVC 120min $p<0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p<0,0013$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede zwischen dem Leerwert und PVC 120min, sowie zw. beiden 120min-Werten.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank FMLP Ox. Burst	0 FMLP Ox. Burst	H FMLP Ox. Burst	P FMLP Ox. Burst
blank FMLP Ox. Burst	0,3138	----	-14,79*	-20,8663*	-25,9775*
0 FMLP Ox. Burst	15,1075	Ja ($p<0,001$)	----	-6,0738*	-11,1850
H FMLP Ox. Burst	21,1818	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	-5,1112*
P FMLP Ox. Burst	26,292225	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----

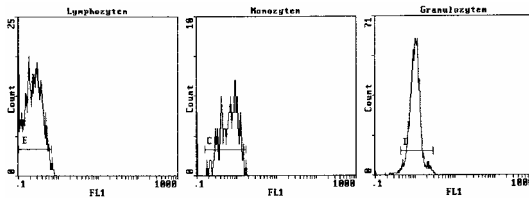
Alle Vergleiche weisen hochsignifikante Unterschiede auf.



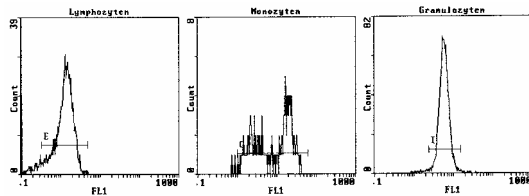
Grafik 3.29 : MW und SF des oxidativen Burst mit FMLP-Nachaktivierung in der Granulozytenpopulation

3.2.2.3 Kallikrein

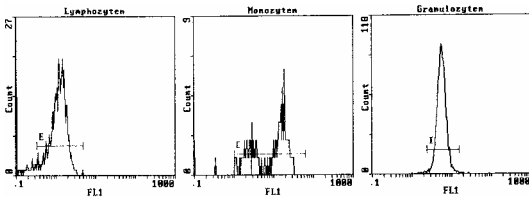
3.2.2.3.1 Ergebnisse optisch



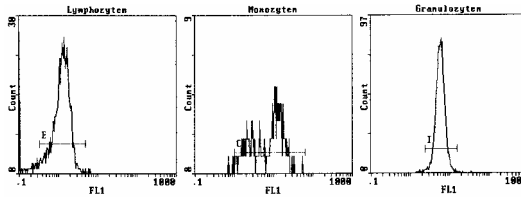
Blank Probe = Autofluoreszenz



Kein Schlauchkontakt = Leerwert „0“



PVC-Kontakt während 120min Rotation



Kontakt mit heparinbeschichtetem Schlauch über 120min Rotation

Abb. 3.16 : Darstellung der Histogramme nach Messung von 10.000 Zellen aus jedem Probenansatz (Autofluoreszenz, Leerwert, 120min heparinbeschichteter Schlauch, 120min PVC-Schlauch).

3.2.2.3.2 Ergebnisse Kallikrein 129min Chandler-Loop

Lymphozyten

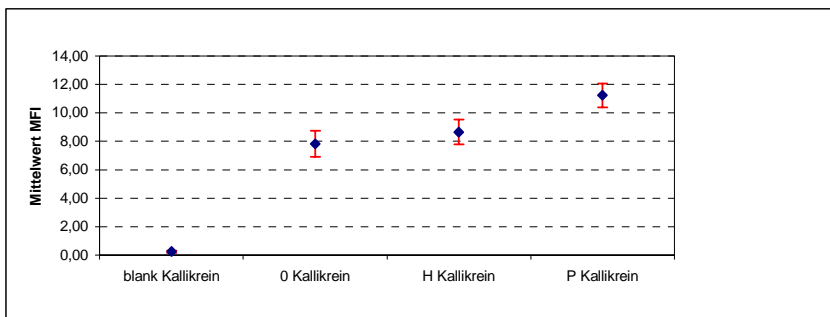
	blank Kallikrein	0 Kallikrein	H Kallikrein	P Kallikrein
gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,238	7,809	8,660	11,236
Std.Fehler des MW	0,068	0,918	0,876	0,842
Varianz	0,037	6,747	6,143	5,677
Std.Abweichung	0,193	2,597	2,478	2,383
Variationskoeffizient	0,811	0,333	0,286	0,212
Median	0,135	6,650	7,695	11,950
Geom. Mittelwert	0,168	7,485	8,373	10,982

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

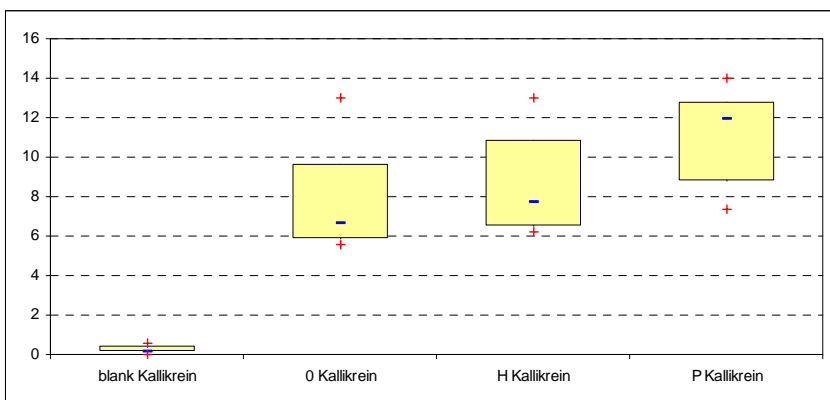
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,513$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,015$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,0524$. **Es besteht ein signifikanter Unterschied zw. dem Leerwert und PVC 120min.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank Kallikrein	0 Kallikrein	H Kallikrein	P Kallikrein
blank Kallikrein	0,237625	----	-7,5734*	-8,4246*	-11,0009*
0 Kallikrein	7,80875	ja ($p<0,001$)	----	-0,8513	-3,4275*
H Kallikrein	8,66	ja ($p<0,001$)	nein ($p=1,0$)	----	-2,5763
P Kallikrein	11,23625	ja ($p<0,001$)	ja ($p<0,001$)	nein ($p=0,143$)	----



Grafik 3.30 : MW und SF des Kallikrein in der Lymphozytenpopulation



Grafik 3.31 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des Kallikrein in der Lymphozytenpopulation

Monozyten

	blank Kallikrein	0 Kallikrein	H Kallikrein	P Kallikrein
gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,587	15,500	18,166	27,200
Std.Fehler des MW	0,137	1,082	1,960	1,459
Varianz	0,150	9,363	30,730	17,040
Std.Abweichung	0,387	3,060	5,543	4,128
Variationskoeffizient	0,659	0,197	0,305	0,152
Median	0,446	16,450	18,031	27,600
geom. Mittelwert	0,483	15,211	17,399	26,894

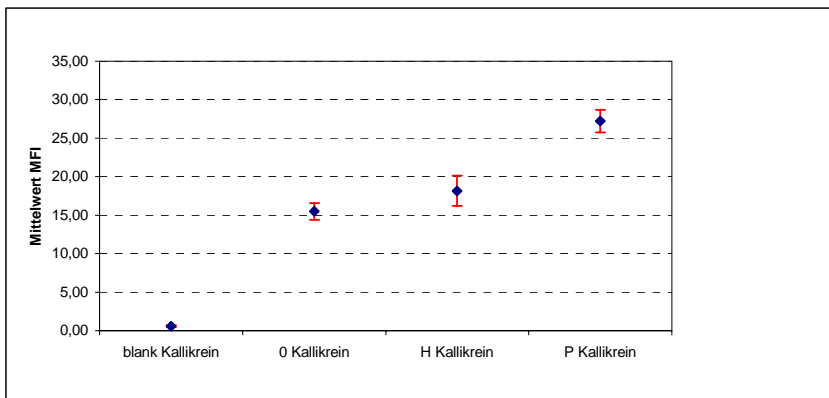
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min p=0,253, Leerwert gegen PVC 120min p<0,0001, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min p=0,002. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede**

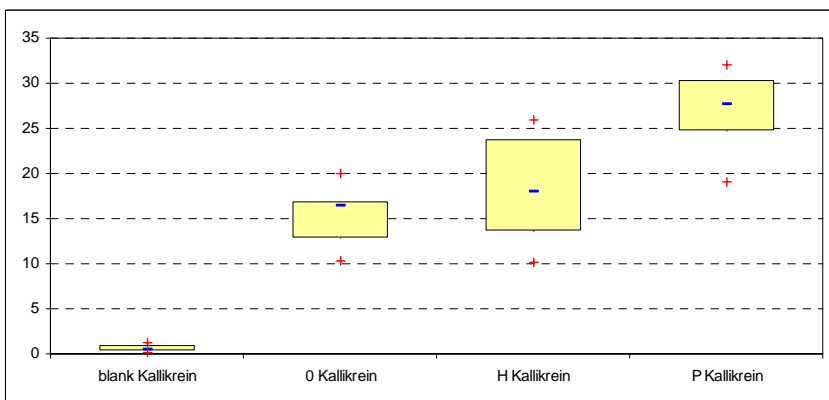
zw. dem Leerwert und heparinbeschichtetem PVC n 120min, sowie zw. beiden 120min-Werten.

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank Kallikrein	0 Kallikrein	H Kallikrein	P Kallikrein
blank Kallikrein	0,587375	----	-14,9125*	-17,5788*	-26,6125*
0 Kallikrein	15,5	Ja ($p<0,001$)	----	-2,6663	-11,7*
H Kallikrein	18,166375	Ja ($p<0,001$)	nein ($p=1,0$)	----	-9,0337*
P Kallikrein	27,2	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----



Grafik 3.32 : MW und SF des Kallikrein in der Monozytenpopulation



Grafik 3.33 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-], Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des Kallikrein in der Monozytenpopulation

Granulozyten

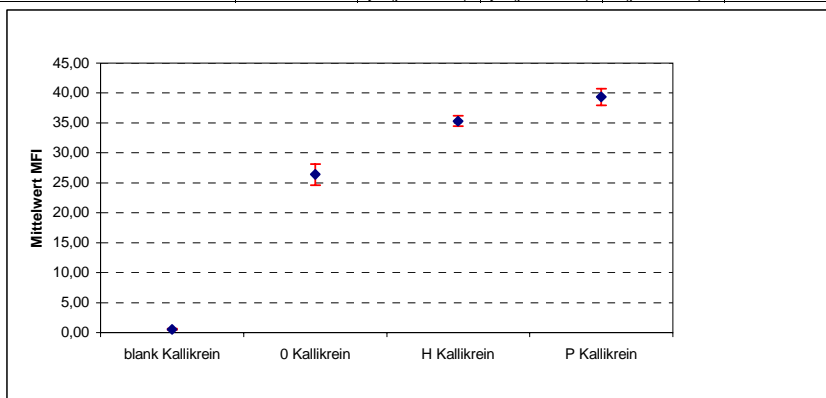
	blank Kallikrein	0 Kallikrein	H Kallikrein	P Kallikrein
gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,558	26,400	35,309	39,326
Std.Fehler des MW	0,087	1,756	0,876	1,383
Varianz	0,060	24,666	6,145	15,296
Std.Abweichung	0,245	4,966	2,479	3,911
Variationskoeffizient	0,439	0,188	0,070	0,099
Median	0,495	27,250	35,500	39,855
geom. Mittelwert	0,514	25,977	35,230	39,141

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

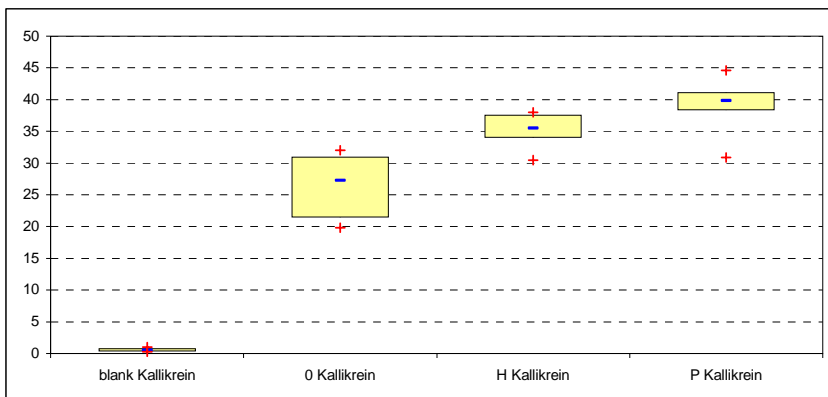
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,0015$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p = 0,278$. **Es besteht ein signifikanter Unterschied zw. beiden 120min-Werten und hochsignifikante Unterschiede zw. den Leerwerten und PVC 120min bzw. heparinbeschichtetem PVC 120min.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank Kallikrein	0 Kallikrein	H Kallikrein	P Kallikrein
blank Kallikrein	0,558125	----	-25,8413*	-34,750*	-38,7675*
0 Kallikrein	26,4	ja ($p < 0,001$)	----	-8,9088*	-12,9263*
H Kallikrein	35,30875	ja ($p < 0,001$)	ja ($p < 0,001$)	----	-4,0175
P Kallikrein	39,32625	ja ($p < 0,001$)	ja ($p < 0,001$)	nein ($p = 0,151$)	----



Grafik 3.34: MW und SF des Kallikrein in der Granulozytenpopulation



Grafik 3.35 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des Kallikrein in der Granulozytenpopulation

3.2.2.3.3 Kallikrein 120min ChandlerLoop mit PMA-Nachaktivierung

Lymphozyten

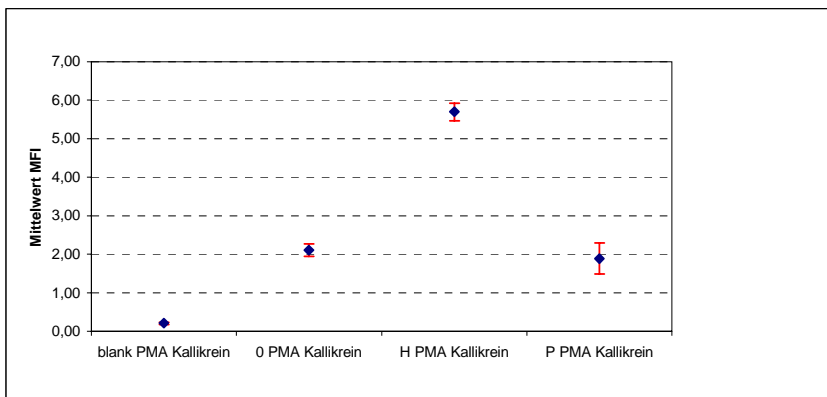
	blank PMA Kallikrein	0 PMA Kallikrein	H PMA Kallikrein	P PMA Kallikrein
gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,206	2,110	5,696	1,889
Std.Fehler des MW	0,025	0,166	0,231	0,405
Varianz	0,005	0,221	0,428	1,311
Std.Abweichung	0,070	0,470	0,654	1,145
Variationskoeffizient	0,342	0,223	0,115	0,606
Median	0,186	2,130	5,730	1,380
geom. Mittelwert	0,196	2,062	5,661	1,658

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

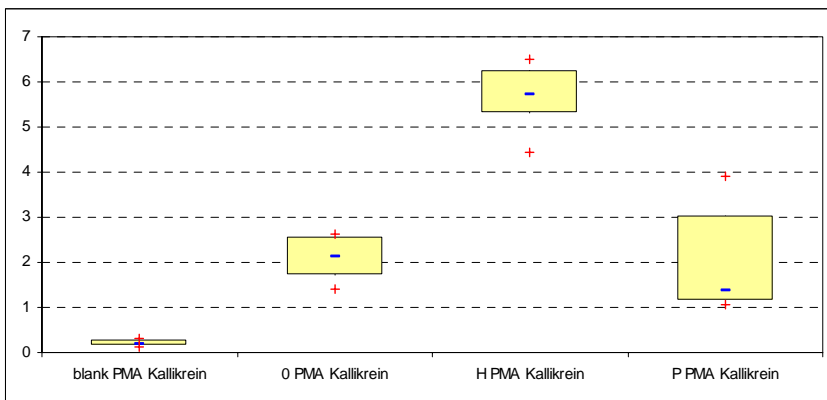
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p = 0,621$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede zwischen dem Leerwert und heparinbeschichtetem PVC 120min, sowie zw. beiden 120min-Werten.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank PMA Kallikrein	0 PMA Kallikrein	H PMA Kallikrein	P PMA Kallikrein
blank PMA Kallikrein	0,2061	----	-1,9025*	-5,4888*	-1,6813*
0 PMA Kallikrein	2,11	Ja ($p < 0,001$)	----	-3,5863*	0,2212
H PMA Kallikrein	5,6962	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	3,8075
P PMA Kallikrein	1,88875	Ja ($p < 0,001$)	Nein ($p = 1,0$)	Ja ($p < 0,001$)	----



Grafik 3.36 : MW und SF des Kallikrein mit PMA-Nachaktivierung in der Lymphozytenpopulation



Grafik 3.37 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des Kallikrein mit PMA-Nachaktivierung in der Lymphozytenpopulation

Monozyten

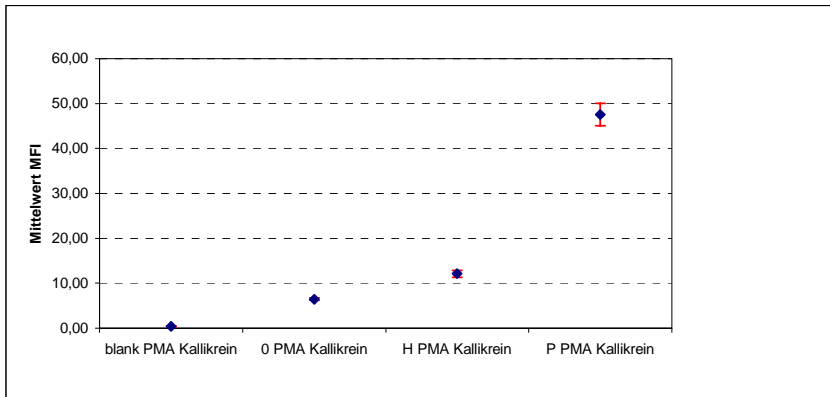
	blank PMA Kallikrein	0 PMA Kallikrein	H PMA Kallikrein	P PMA Kallikrein
Gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,398	6,441	12,100	47,553
Std.Fehler des MW	0,109	0,241	0,717	2,489
Varianz	0,096	0,465	4,114	49,552
Std.Abweichung	0,310	0,682	2,028	7,039
Variationskoeffizient	0,778	0,106	0,168	0,148
Median	0,395	6,165	11,500	50,000
geom. Mittelwert	----	6,412	11,967	47,040

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

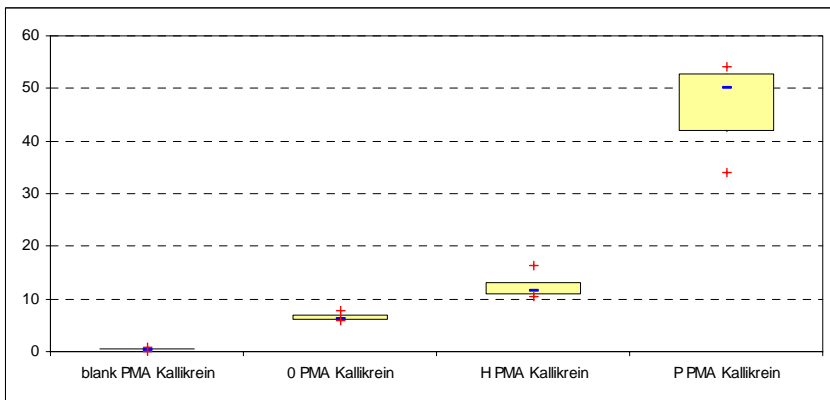
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, Heparin 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank PMA Kallikrein	0 PMA Kallikrein	H PMA Kallikrein	P PMA Kallikrein
blank PMA Kallikrein	0,398	----	-6,0425*	-11,7013*	-47,1537*
0 PMA Kallikrein	6,44125	Ja ($p = 0,017$)	----	-5,6588*	-41,1113*
H PMA Kallikrein	12,1	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p = 0,028$)	----	-35,4525*
P PMA Kallikrein	47,5525	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----



Grafik 3.38 : MW und SF des Kallikrein mit PMA-Nachaktivierung in der Monozytenpopulation



Grafik 3.39 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-], Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des Kallikrein mit PMA-Nachaktivierung in der Monozytenpopulation

Granulozyten

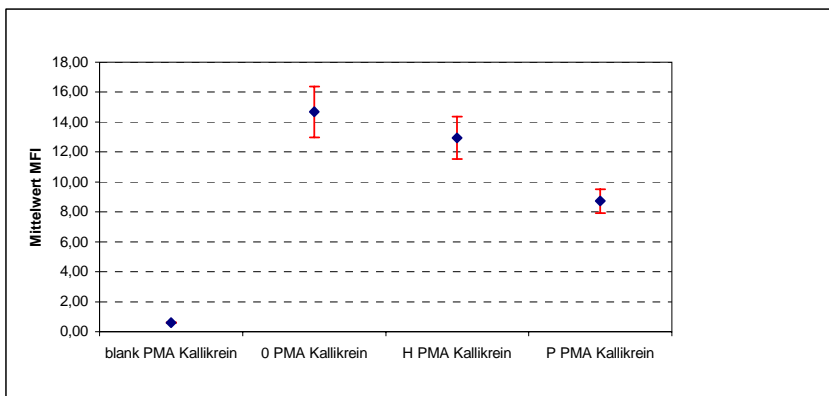
	blank PMA Kallikrein	0 PMA Kallikrein	H PMA Kallikrein	P PMA Kallikrein
gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,597	14,686	12,946	8,715
Std.Fehler des MW	0,021	1,699	1,424	0,811
Varianz	0,003	23,106	16,213	5,261
Std.Abweichung	0,059	4,807	4,027	2,294
Variationskoeffizient	0,098	0,327	0,311	0,263
Median	0,590	14,100	13,500	9,850
geom. Mittelwert	0,595	13,995	12,362	8,414

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

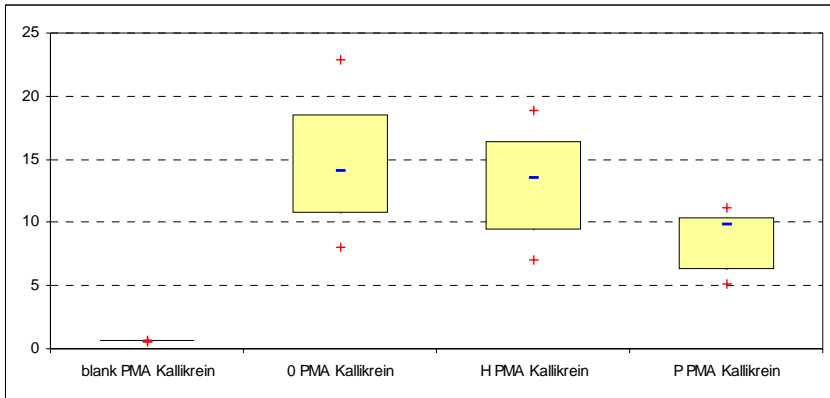
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,4456$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,0068$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,0217$. **Es bestehen signifikante Unterschiede zw. Leerwert und heparinbeschichtetem PVC 120min, sowie zw. beiden 120min-Werten, ein hochsignifikanter Unterschied findet sich zw. dem Leerwert und PVC 120min.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank PMA Kallikrein	0 PMA Kallikrein	H PMA Kallikrein	P PMA Kallikrein
blank PMA Kallikrein	0,597	----	-14,0888*	-12,3488*	-8,1175*
0 PMA Kallikrein	14,686	Ja ($p<0,001$)	----	1,7400	5,9713*
H PMA Kallikrein	12,946	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	----	4,2313
P PMA Kallikrein	8,715	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,008$)	Nein ($p=0,103$)	----



Grafik 3.40 : MW und SF des Kallikrein mit PMA-Nachaktivierung in der Granulozytenpopulation



Grafik 3.41 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-], Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des Kallikrein mit PMA-Nachaktivierung in der Granulozytenpopulation

3.2.2.3.4 Kallikrein 120min Chandler-Loop mit FMLP-Nachaktivierung

Lymphozyten

	blank FMLP Kallikrein	0 FMLP Kallikrein	H FMLP Kallikrein	P FMLP Kallikrein
gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,528	5,058	6,461	10,040
Std.Fehler des MW	0,183	0,446	0,236	0,224
Varianz	0,267	1,593	0,445	0,402
Std.Abweichung	0,516	1,262	0,667	0,634
Variationskoeffizient	0,978	0,250	0,103	0,063
Median	0,258	4,750	6,545	9,985
geom. Mittelwert	0,343	4,934	6,429	10,022

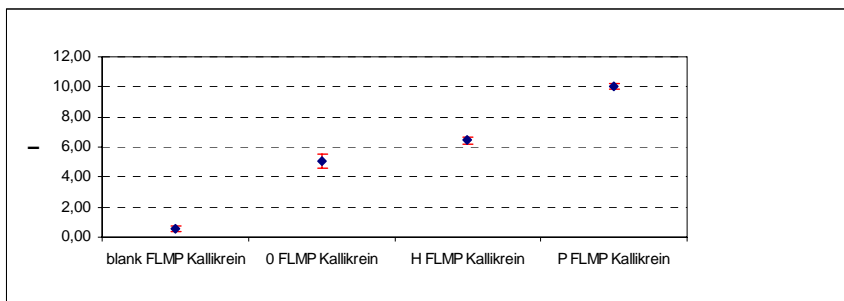
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,014$, Leerwert gegen PVC 120min $p<0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p<0,001$. **Die Vergleiche zeigen hochsignifikante Unterschiede, außer zw. dem Leerwert und heparinbeschichtetem PVC 120min (sign.)**

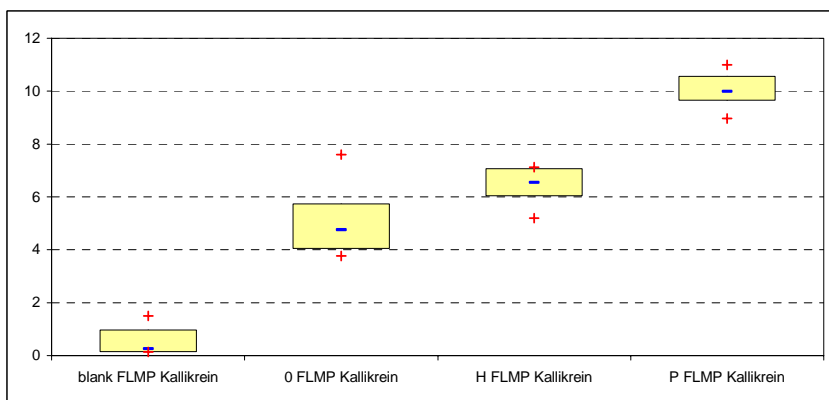
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank FMLP Kallikrein	0 FMLP Kallikrein	H FMLP Kallikrein	P FMLP Kallikrein
blank FMLP Kallikrein	0,528125	----	-4,5288*	-5,9325*	-9,5112
0 FMLP Kallikrein	5,0575	Ja ($p<0,001$)	----	-1,4037*	-4,9825*
H FMLP Kallikrein	6,46125	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,012$)	----	-3,5787*

P FMLP Kallikrein	10,04	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----
--------------------------	-------	--------------	--------------	--------------	------



Grafik 3.42 : MW und SF des Kallikrein mit FMLP-Nachaktivierung in der Lymphozytenpopulation



Grafik 3.43 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des Kallikrein mit FMLP-Nachaktivierung in der Lymphozytenpopulation

Monozyten

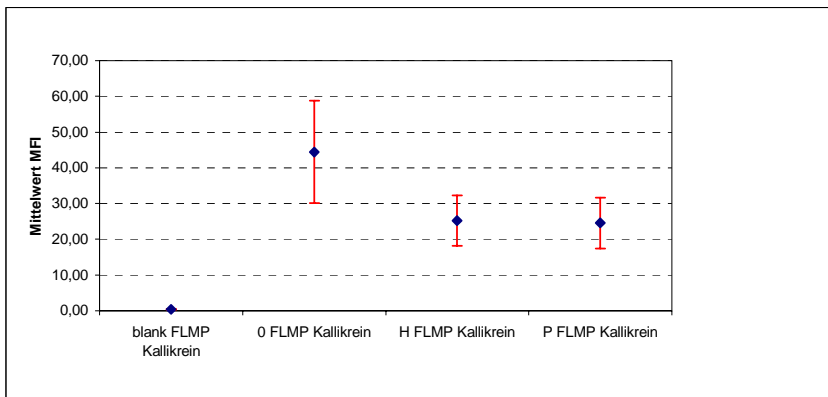
	blank FMLP Kallikrein	0 FLMP Kallikrein	H FLMP Kallikrein	P FLMP Kallikrein
gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,371	44,413	25,218	24,576
Std.Fehler des MW	0,087	14,313	7,071	7,136
Varianz	0,060	1638,827	400,003	407,391
Std.Abweichung	0,245	40,482	20,000	20,184
Variationskoeffizient	0,660	0,912	0,793	0,821
Median	0,375	30,000	23,250	22,550
geom. Mittelwert	----	27,584	18,811	16,928

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,249$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,235$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,95$. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank FMLP Kallikrein	0 FMLP Kallikrein	H FMLP Kallikrein	P FMLP Kallikrein
blank FMLP Kallikrein	0,2061	----	-44,0412*	-24,8575	-24,2050
0 FMLP Kallikrein	2,11	Ja ($p=0,008$)	----	19,1837	19,8362
H FMLP Kallikrein	5,6962	Nein ($p=0,325$)	Nein ($p=0,792$)	----	0,6525
P FMLP Kallikrein	1,88875	Nein ($p=0,362$)	Nein ($p=0,719$)	Nein ($p=1,0$)	----



Grafik 3.44 : MW und SF des Kallikrein mit FMLP-Nachaktivierung in der Monozytenpopulation

Granulozyten

	blank FMLP Kallikrein	0 FMLP Kallikrein	H FMLP Kallikrein	P FMLP Kallikrein
gültige Fälle	8,000	8,000	8,000	8,000
Mittelwert	0,413	11,350	15,125	14,700
Std.Fehler des MW	0,070	0,711	0,972	0,838
Varianz	0,039	4,040	7,554	5,620
Std.Abweichung	0,197	2,010	2,748	2,371
Variationskoeffizient	0,476	0,177	0,182	0,161
Median	0,412	11,400	14,300	14,900
geom. Mittelwert	----	11,186	14,916	14,532

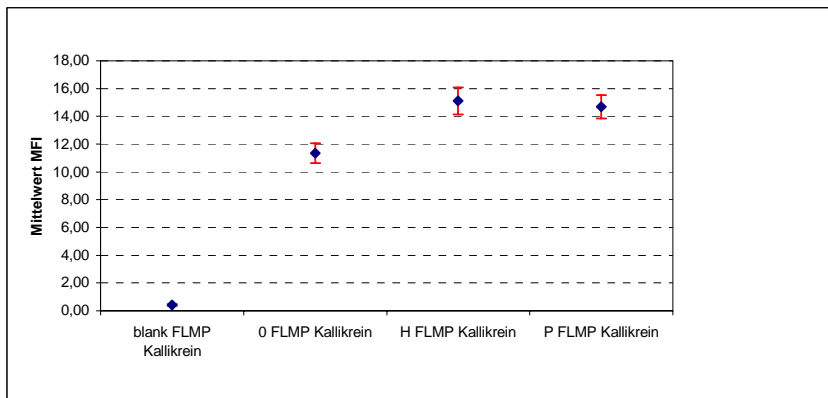
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,007$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,0087$, heparinbeschichtetes PVC

120min gegen PVC 120min $p=0,745$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede dem Leerwert und den 120min Werten des heparinbeschichteten PVC und PVC.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank FMLP Kallikrein	0 FMLP Kallikrein	H FMLP Kallikrein	P FMLP Kallikrein
blank FMLP Kallikrein	0,4134	----	-10,9363*	-14,7113*	-14,2863*
0 FMLP Kallikrein	11,35	Ja ($p<0,001$)	----	-3,77*	-3,3500*
H FMLP Kallikrein	15,125	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,07$)	----	0,4250
P FMLP Kallikrein	14,7	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,019$)	Nein ($p=1,0$)	----



Grafik 3.45 : MW und SF des Kallikrein mit FMLP-Nachaktivierung in der Granulozytenpopulation

3.2.2.3.5 Kallikrein 120min ChandlerLoop mit 5 Stunden Nachbebrütung

Lymphozyten

	blank Kallikrein bebrütet	0 Kallikrein bebrütet	H Kallikrein bebrütet	P Kallikrein bebrütet
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,156	2,975	3,033	5,000
Std.Fehler des MW	0,032	0,054	0,036	0,089
Varianz	0,006	0,018	0,008	0,048
Std.Abweichung	0,079	0,133	0,088	0,219
Variationskoeffizient	0,507	0,045	0,029	0,044
Median	0,165	2,975	3,025	5,050
geom. Mittelwert	0,120	2,973	3,032	4,996

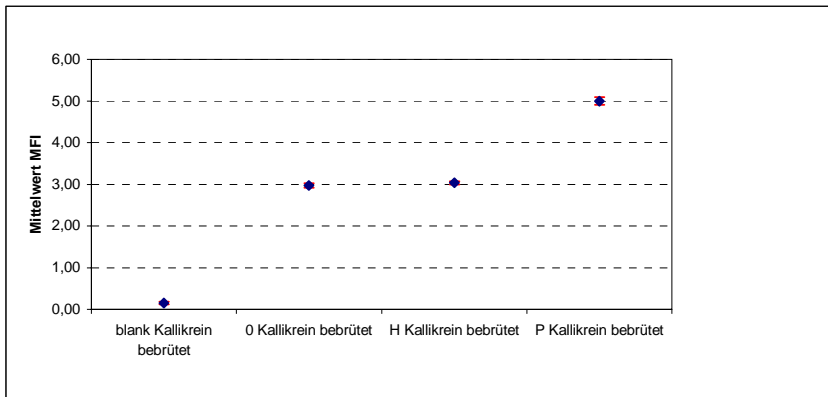
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,39$, Leerwert gegen PVC 120min $p<0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p<0,001$. **Hochsignifikante Unterschiede zw. Leerwert**

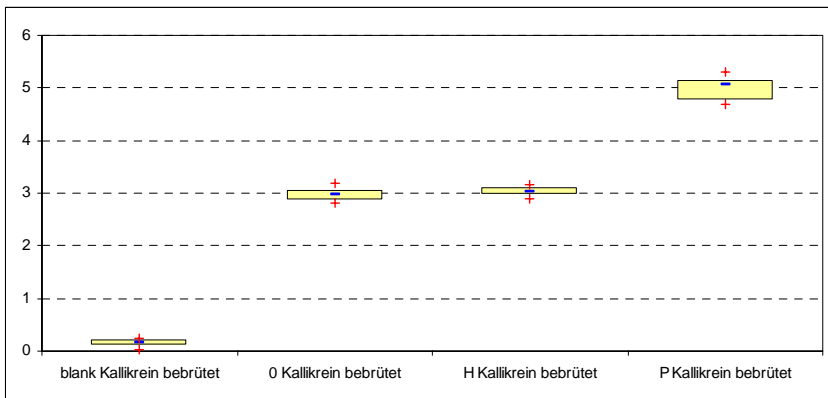
und PVC120min, sowie zw. heparinbeschichtetem PVC 120min und PVC 120min.

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank Kallikrein bebrütet	0 Kallikrein bebrütet	H Kallikrein bebrütet	P Kallikrein bebrütet
blank Kallikrein bebrütet	0,156	----	-2,8183*	-2,8767*	-4,8433*
0 Kallikrein bebrütet	2,975	Ja ($p<0,001$)	----	-5833E-02	-2,0250*
H Kallikrein bebrütet	3,033	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	----	-1,9667*
P Kallikrein bebrütet	5	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----



Grafik 3.46 : MW und SF des Kallikrein mit Bebrütung in der Lymphozytenpopulation



Grafik 3.47 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des Kallikrein mit nachfolgender Bebrütung in der Lymphozytenpopulation

Monozyten

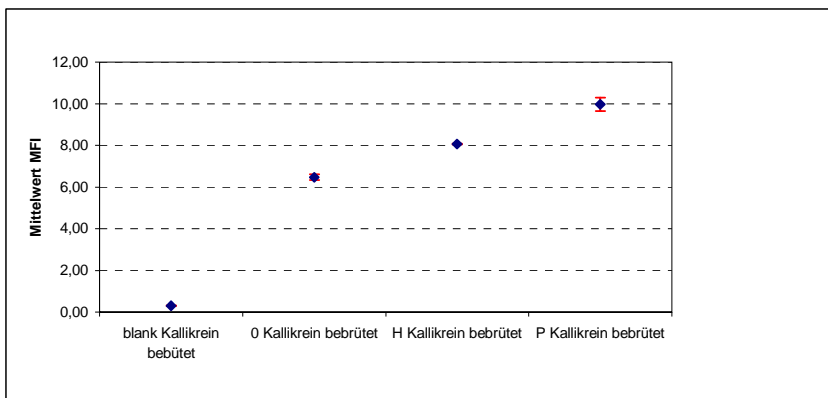
	blank Kallikrein bebrütet	0 Kallikrein bebrütet	H Kallikrein bebrütet	P Kallikrein bebrütet
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,307	6,475	8,062	9,975
Std.Fehler des MW	0,017	0,144	0,022	0,322
Varianz	0,002	0,125	0,003	0,624
Std.Abweichung	0,042	0,353	0,053	0,790
Variationskoeffizient	0,136	0,055	0,007	0,079
Median	0,315	6,425	8,075	10,150
geom. Mittelwert	0,304	6,467	8,062	9,949

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

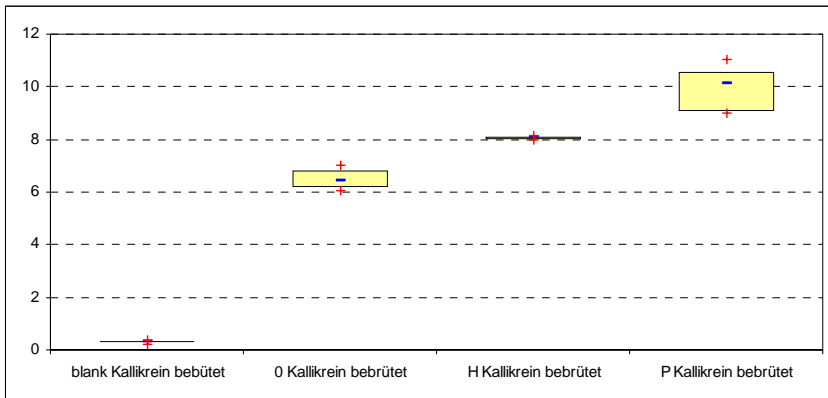
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank Kallikrein bebrütet	0 Kallikrein bebrütet	H Kallikrein bebrütet	P Kallikrein bebrütet
blank Kallikrein bebrütet	0,306666667	----	-6,1683*	-7,7550*	-9,6683*
0 Kallikrein bebrütet	6,475	Ja ($p < 0,001$)	----	-1,5867*	-3,5*
H Kallikrein bebrütet	8,061666667	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-1,9133*
P Kallikrein bebrütet	9,975	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----



Grafik 3.48 : MW und SF des Kallikrein mit nachfolgender Bebrütung in der Monozytenpopulation



Grafik 3.49 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des Kallikrein mit nachfolgender Bebrütung in der Monozytenpopulation

Granulozyten

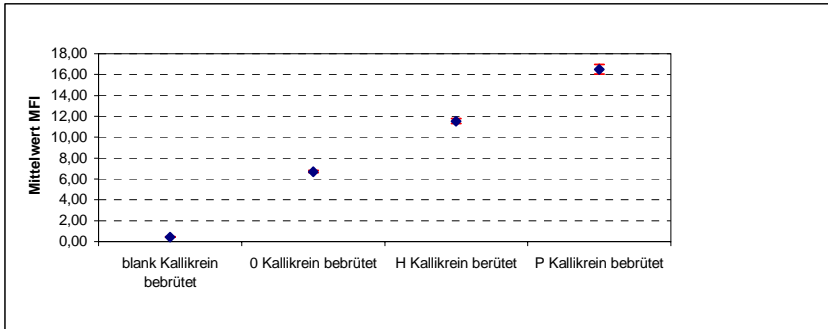
	blank Kallikrein bebrütet	0 Kallikrein bebrütet	H Kallikrein bebrütet	P Kallikrein bebrütet
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,442	6,698	11,533	16,508
Std.Fehler des MW	0,027	0,110	0,233	0,454
Varianz	0,004	0,072	0,327	1,238
Std.Abweichung	0,065	0,269	0,572	1,113
Variationskoeffizient	0,148	0,040	0,050	0,067
Median	0,450	6,675	11,500	15,950
geom. Mittelwert	0,437	6,694	11,522	16,478

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

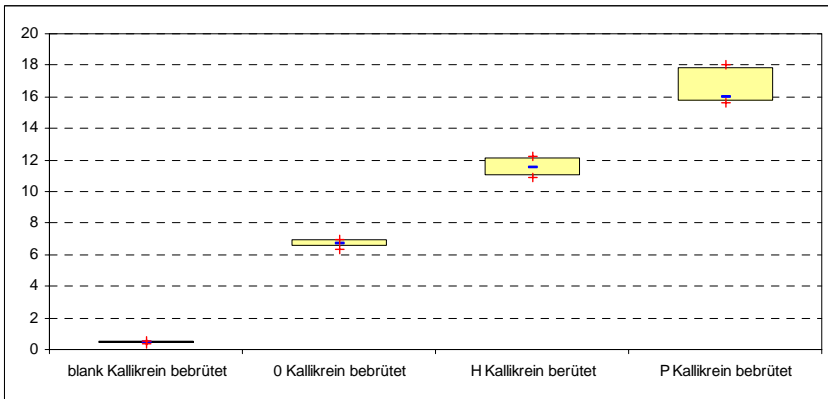
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,0001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,0001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank Kallikrein bebrütet	0 Kallikrein bebrütet	H Kallikrein bebrütet	P Kallikrein bebrütet
blank Kallikrein bebrütet	0,441666667	----	-6,2567*	-11,0,17*	-16,0667*
0 Kallikrein bebrütet	6,698333333	Ja ($p < 0,001$)	----	-4,8350*	-9,8100*
H Kallikrein bebrütet	11,53333333	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-4,9750*
P Kallikrein bebrütet	16,50833333	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----



Grafik 3.50 : MW und SF des Kallikrein mit nachfolgender Bebrütung in der Granulozytenpopulation



Grafik 3.51 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des Kallikrein mit nachfolgender Bebrütung in der Granulozytenpopulation

3.2.2.4 Ergebnisse RGEs-Elastase

Lymphozyten

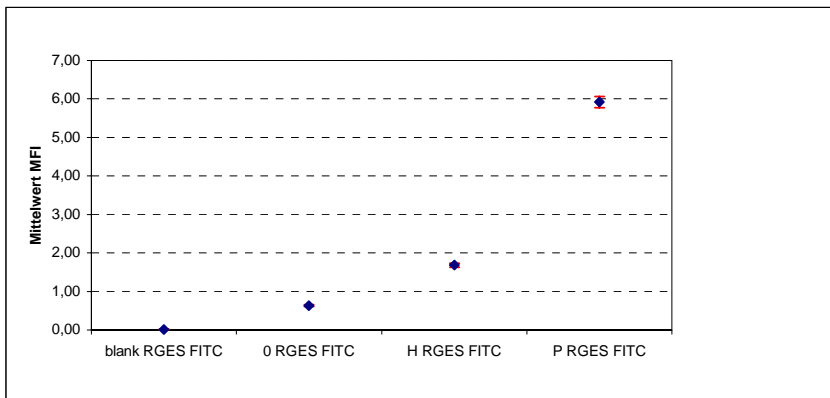
	blank RGEs FITC	0 RGEs FITC	H RGEs FITC	P RGEs FITC
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,017	0,633	1,684	5,920
Std.Fehler des MW	0,004	0,028	0,053	0,147
Varianz	0,000	0,005	0,017	0,129
Std.Abweichung	0,011	0,068	0,129	0,360
Variationskoeffizient	0,622	0,107	0,077	0,061
Median	0,016	0,621	1,690	5,990
geom. Mittelwert	0,014	0,630	1,680	5,911

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

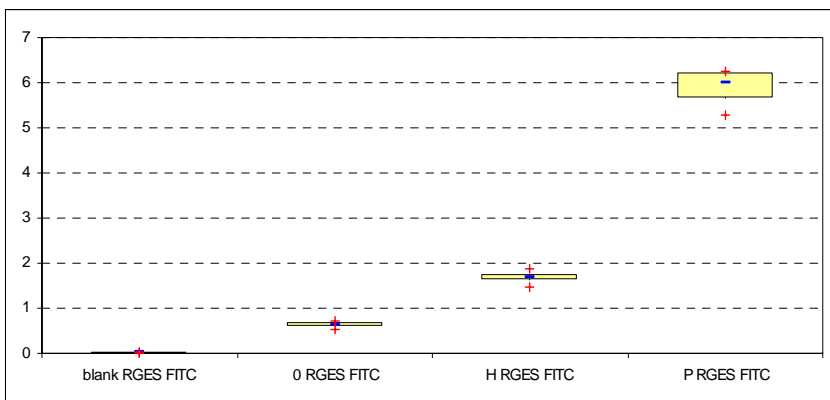
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank RGES FITC	0 RGES FITC	H RGES FITC	P RGES FITC
blank RGES FITC	0,0172	----	-0,6153*	-1,6668*	-5,9027*
0 RGES FITC	0,632733333	Ja ($p < 0,001$)	----	-1,0515*	-5,2573*
H RGES FITC	1,684166667	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-4,2358*
P RGES FITC	5,92	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----



Grafik 3.52 : MW und SF der RGES-Elastase in der Lymphozytenpopulation



Grafik 3.53 : Box-&Whisker-Grafik (Med. [-], Min./Max [+], 25./95. Perz. [Box]) der RGES-Elastase in der Lymphozytenpopulation

Monozyten

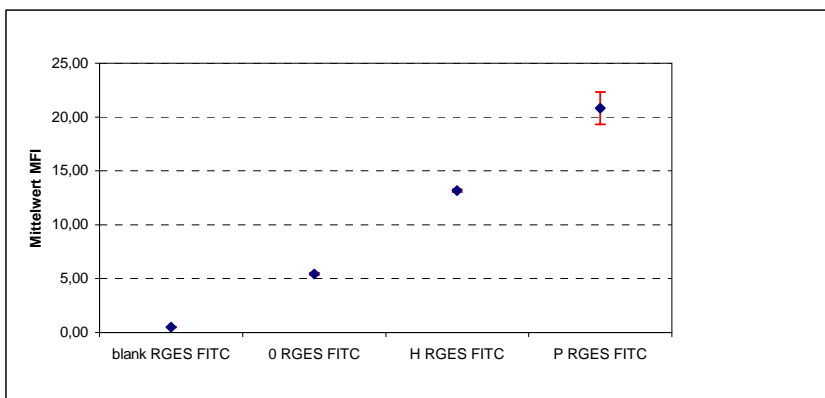
	blank RGES FITC	0 RGES FITC	H RGES FITC	P RGES FITC
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,505	5,455	13,180	20,807
Std.Fehler des MW	0,040	0,108	0,126	1,506
Varianz	0,010	0,070	0,095	13,612
Std.Abweichung	0,099	0,265	0,308	3,689
Variationskoeffizient	0,195	0,049	0,023	0,177
Median	0,520	5,405	13,050	22,590
geom. Mittelwert	0,496	5,450	13,177	20,472

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

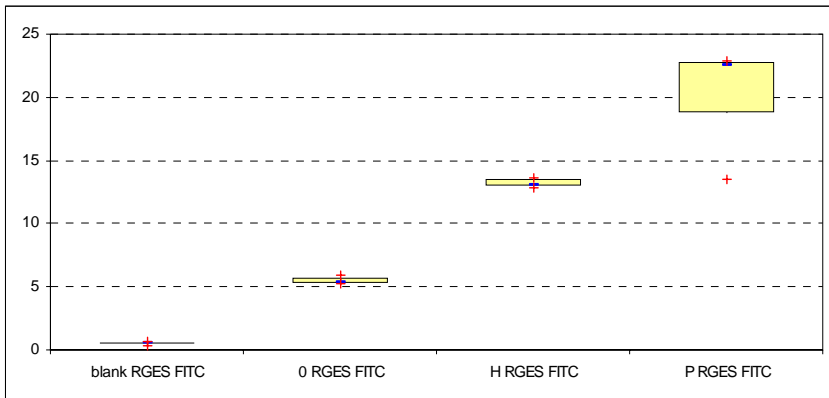
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, Heparin 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank RGES FITC	0 RGES FITC	H RGES FITC	P RGES FITC
blank RGES FITC	0,505	----	-4,95*	-12,6750*	-20,30*
0 RGES FITC	5,455	Ja ($p = 0,001$)	----	-7,725*	-15,3517*
H RGES FITC	13,18	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-7,6267*
P RGES FITC	20,80666667	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----



Grafik 3.54 : MW und SF der RGES-Elastase in der Monozytenpopulation



Graphik 3.55 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der RGES-Elastase in der Monozytenpopulation

Granulozyten

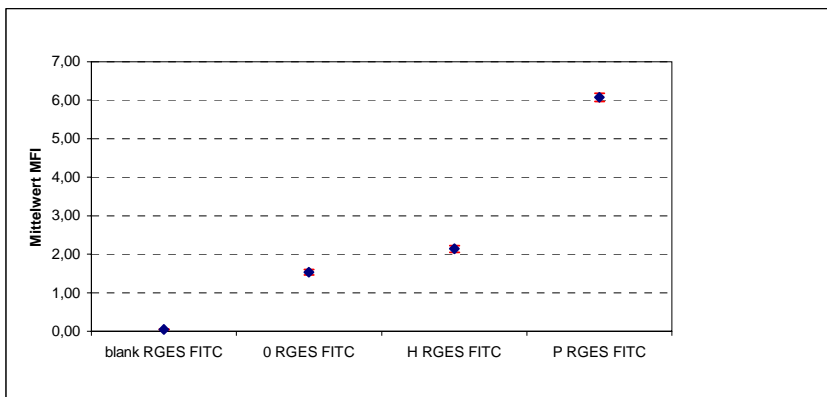
	blank RGES FITC	0 RGES FITC	H RGES FITC	P RGES FITC
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,051	1,537	2,138	6,075
Std.Fehler des MW	0,011	0,071	0,090	0,110
Varianz	0,001	0,030	0,049	0,073
Std.Abweichung	0,028	0,173	0,221	0,270
Variationskoeffizient	0,550	0,112	0,104	0,045
Median	0,054	1,555	2,075	6,005
geom. Mittelwert	0,039	1,528	2,130	6,070

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

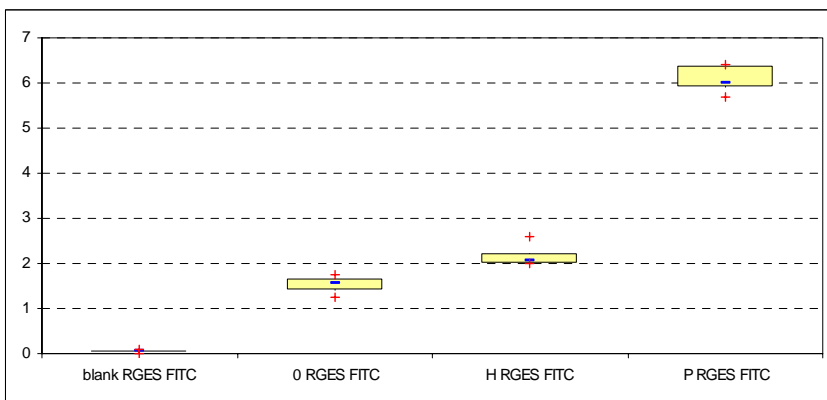
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank RGES FITC	0 RGES FITC	H RGES FITC	P RGES FITC
blank RGES FITC	0,051	----	-1,485*	-2,0867	-6,0233*
0 RGES FITC	1,536666667	Ja ($p < 0,001$)	----	-0,6017*	-4,5383*
H RGES FITC	2,138333333	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-3,9367*
P RGES FITC	6,075	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----



Grafik 3.56 : MW und SF der RGES-Elastase in der Granulozytenpopulation



Grafik 3.57 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der RGES-Elastase in der Granulozytenpopulation

3.2.2.5 Ergebnisse AAPV-Elastase

Lymphozyten

	blank AAPV FITC	0 AAPV FITC	H AAPV FITC	P AAPV FITC
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,256	4,035	4,438	6,257
Std.Fehler des MW	0,027	0,095	0,049	0,137
Varianz	0,004	0,054	0,014	0,112
Std.Abweichung	0,066	0,232	0,120	0,335
Variationskoeffizient	0,259	0,057	0,027	0,054
Median	0,276	3,950	4,470	6,250

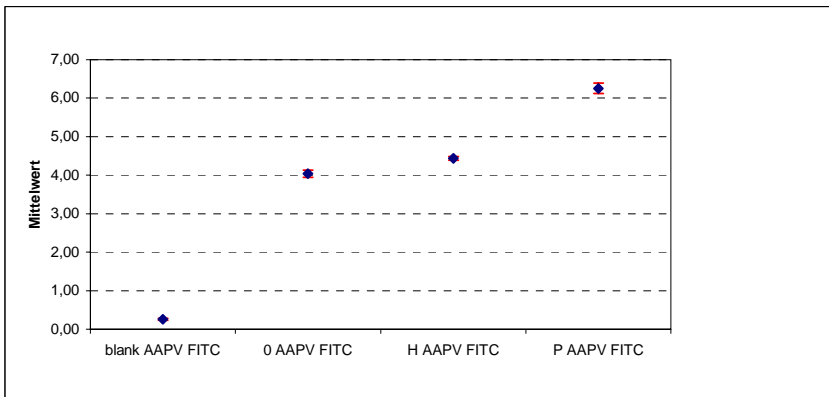
geom. Mittelwert	0,246	4,030	4,437	6,249
------------------	-------	-------	-------	-------

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

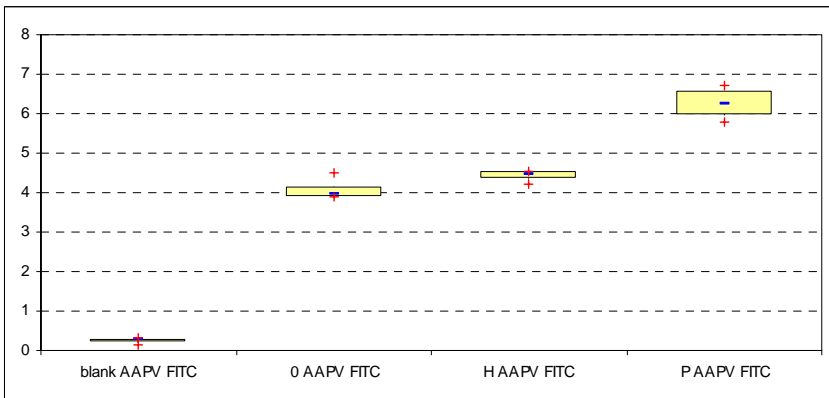
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,0036$, Leerwert gegen PVC 120min $p<0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p<0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank AAPV FITC	0 AAPV FITC	H AAPV FITC	P AAPV FITC
blank AAPV FITC	0,255666667	----	-3,7783*	-4,1817*	-6,0*
0 AAPV FITC	4,035	Ja ($p<0,001$)	----	3,7783*	-0,4033*
H AAPV FITC	4,438333333	ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,024$)	----	-2,2217*
P AAPV FITC	6,256666667	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----



Grafik 3.58 : MW und SF der AAPV-Elastase in der Lymphozytenpopulation



Grafik 3.59 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der AAPV-Elastase in der Lymphozytenpopulation

Monozyten

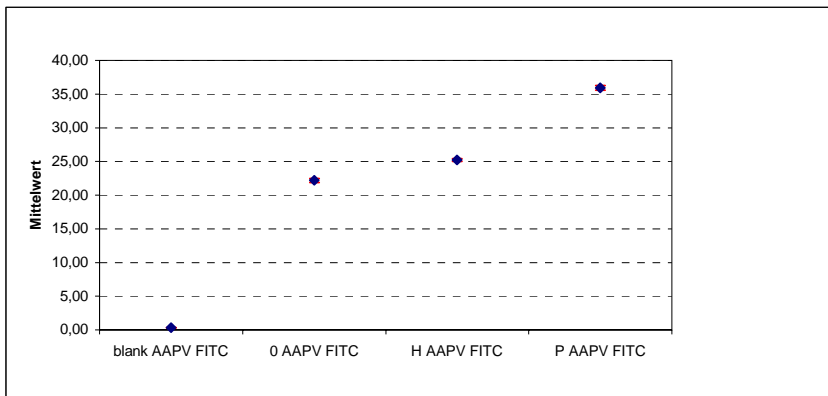
	blank AAPV FITC	0 AAPV FITC	H AAPV FITC	P AAPV FITC
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,320	22,176	25,207	35,929
Std.Fehler des MW	0,011	0,286	0,209	0,312
Varianz	0,001	0,491	0,263	0,586
Std.Abweichung	0,026	0,700	0,513	0,765
Variationskoeffizient	0,082	0,032	0,020	0,021
Median	0,320	22,063	25,287	35,757
geom. Mittelwert	0,319	22,167	25,202	35,922

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

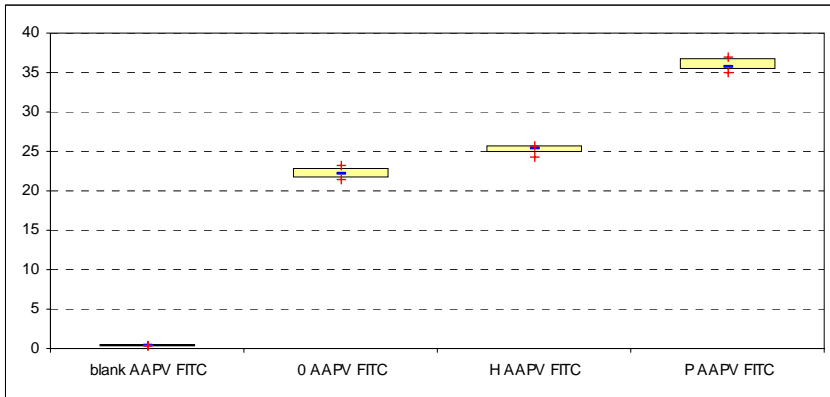
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,0036$, Leerwert gegen PVC 120min $p<0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p<0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank AAPV FITC	0 AAPV FITC	H AAPV FITC	P AAPV FITC
blank AAPV FITC	0,319833333	----	-21,8550*	-24,8850*	-35,6083*
0 AAPV FITC	22,17616667	Ja ($p<0,001$)	----	-3,030*	-13,7533*
H AAPV FITC	25,20678333	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	-10,7233*
P AAPV FITC	35,92916667	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----



Grafik 3.60 : MW und SF der AAPV-Elastase in der Monozytenpopulation



Graphik 3.61 : Box&Whisker-Graphik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der AAPV-Elastase in der Monozytenpopulation

Granulozyten

	blank AAPV FITC	0 AAPV FITC	H AAPV FITC	P AAPV FITC
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,273	11,278	15,398	21,097
Std.Fehler des MW	0,011	0,348	0,161	0,213
Varianz	0,001	0,727	0,155	0,272
Std.Abweichung	0,028	0,853	0,394	0,522
Variationskoeffizient	0,102	0,076	0,026	0,025
Median	0,267	11,200	15,379	21,160
geom. Mittelwert	0,271	11,252	15,394	21,091

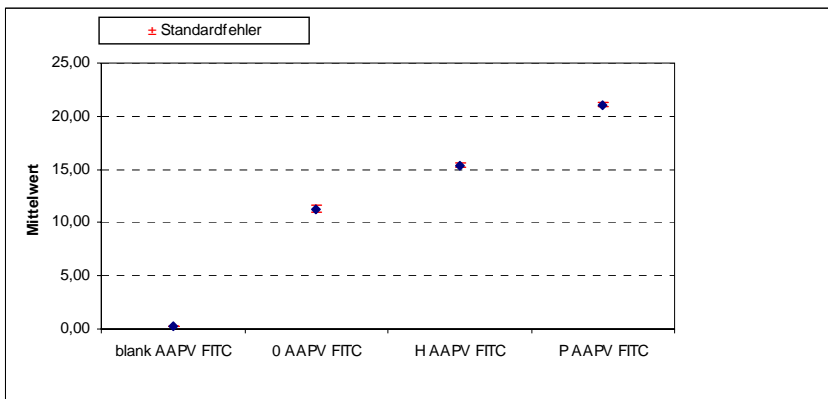
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,0036$, Leerwert gegen PVC 120min $p<0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p<0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

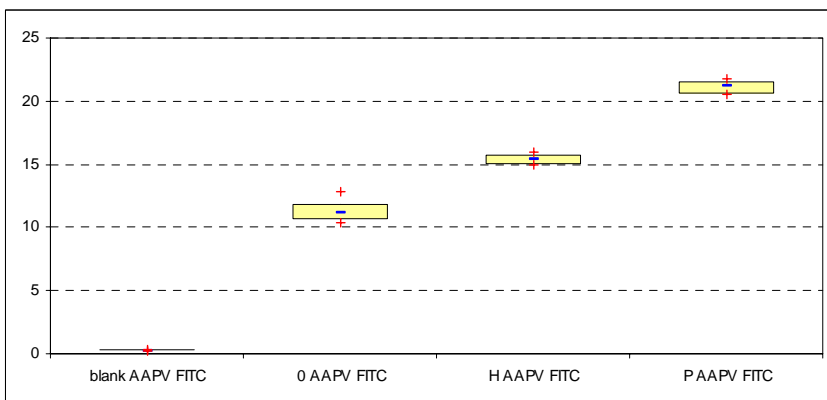
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank AAPV FITC	0 AAPV FITC	H AAPV FITC	P AAPV FITC
blank AAPV FITC	0,272616667	----	-11,0033*	-15,1233*	-20,8517*
0 AAPV FITC	11,27833333	Ja ($p<0,001$)	----	-4,1200*	-9,8483*
H AAPV FITC	15,39783333	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	-5,7283*
P AAPV FITC	21,09666667	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----

Granulozyten



Grafik 3.62 : MW und SF der AAPV-Elastase in der Granulozytenpopulation



Grafik 3.63 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der AAPV-Elastase in der Granulozytenpopulation

3.2.2.6 Ergebnisse Peroxide Lymphozyten

	blank Peroxide FITC	0 Peroxide FITC	H Peroxide FITC	P Peroxide FITC
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,007	3,468	7,678	12,493
Std.Fehler des MW	0,001	0,036	0,226	0,197
Varianz	0,000	0,008	0,307	0,233
Std.Abweichung	0,002	0,088	0,554	0,483
Variationskoeffizient	0,376	0,025	0,072	0,039
Median	0,006	3,475	7,653	12,564
geom. Mittelwert	0,006	3,467	7,662	12,485

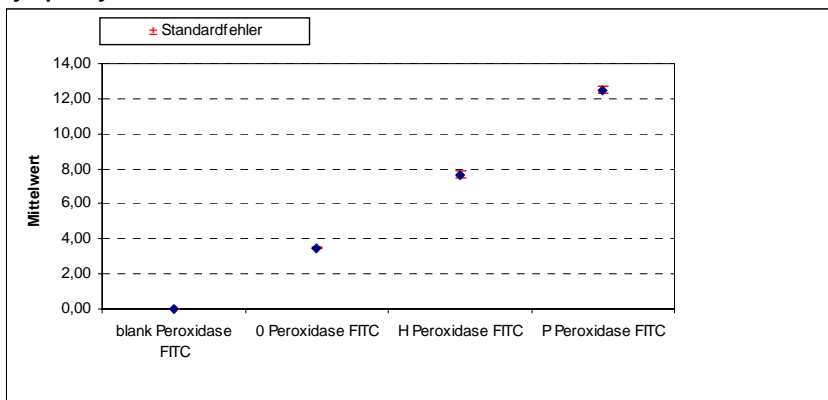
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

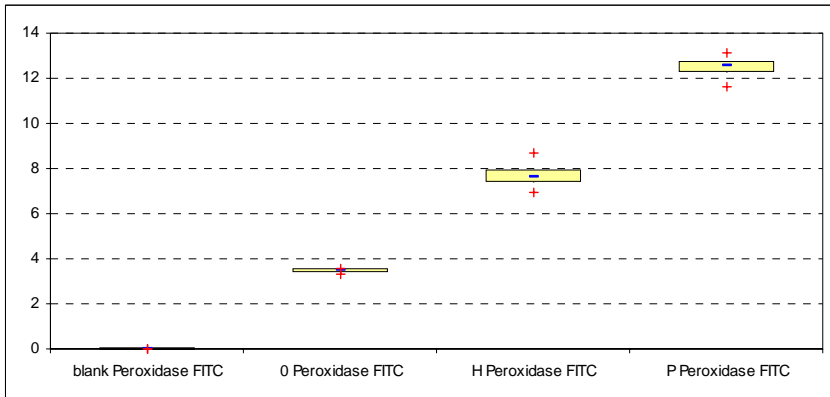
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank Peroxide FITC	0 Peroxide FITC	H Peroxide FITC	P Peroxide FITC
blank Peroxide FITC	0,006545	----	-3,4618*	-7,6715*	-12,4867*
0 Peroxide FITC	3,468333333	Ja ($p < 0,001$)	----	-4,20997*	-9,0248*
H Peroxide FITC	7,678028333	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-4,8152
P Peroxide FITC	12,49301	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----

Lymphozyten



Grafik 3.64 : MW und SF der Peroxide in der Lymphozytenpopulation



Graphik 3.65 : Box&Whisker-Graphik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der Peroxide in der Lymphozytenpopulation

Monozyten

	blank Peroxide FITC	0 Peroxide FITC	H Peroxide FITC	P Peroxide FITC
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,063	4,293	9,330	18,707
Std.Fehler des MW	0,007	0,147	0,115	0,313
Varianz	0,000	0,129	0,079	0,588
Std.Abweichung	0,016	0,360	0,281	0,767
Variationskoeffizient	0,260	0,084	0,030	0,041
Median	0,060	4,140	9,442	18,478
geom. Mittelwert	0,061	4,281	9,327	18,694

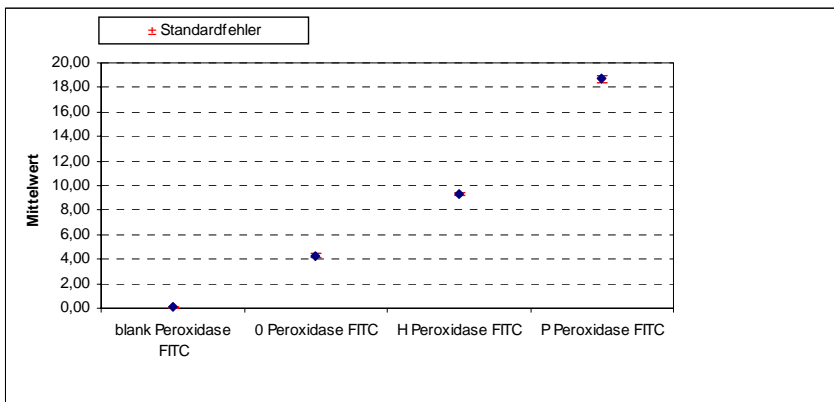
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

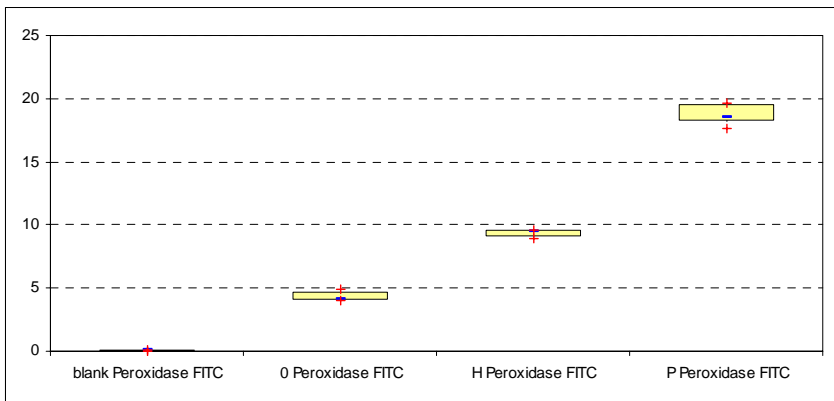
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank Peroxide FITC	0 Peroxide FITC	H Peroxide FITC	P Peroxide FITC
blank Peroxide FITC	0,0625	----	-4,2375*	-9,2725*	-18,6508*
0 Peroxide FITC	4,293333333	Ja ($p < 0,001$)	----	-5,0350*	-14,4133*
H Peroxide FITC	9,330416667	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-9,3783*
P Peroxide FITC	18,70673333	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----

Monozyten



Grafik 3.66 : MW und SF der Peroxide in der Monozytenpopulation



Grafik 3.67 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der Peroxide in der Monozytenpopulation

Granulozyten

	blank Peroxide FITC	0 Peroxide FITC	H Peroxide FITC	P Peroxide FITC
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	1,040	2,671	10,260	17,840
Std.Fehler des MW	0,061	0,285	0,159	0,406
Varianz	0,022	0,487	0,151	0,990
Std.Abweichung	0,149	0,698	0,389	0,995
Variationskoeffizient	0,143	0,261	0,038	0,056
Median	1,065	2,895	10,110	17,500
geom. Mittelwert	1,030	2,586	10,254	17,817

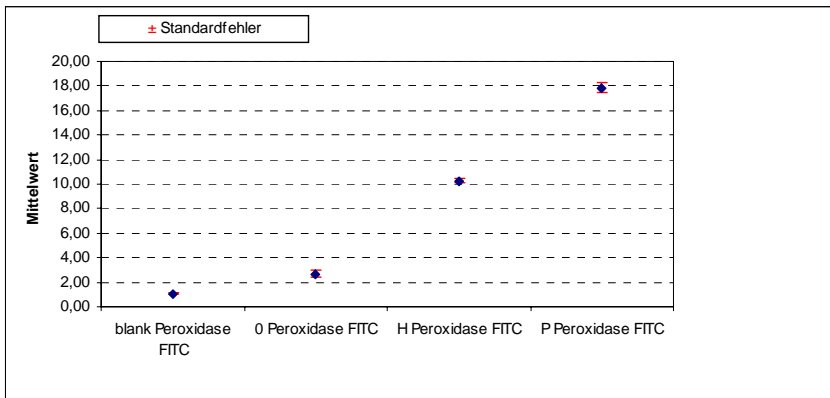
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

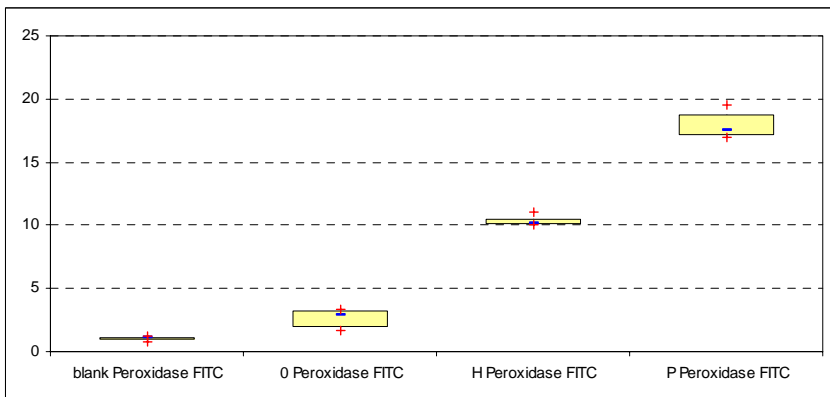
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	blank Peroxide FITC	0 Peroxide FITC	H Peroxide FITC	P Peroxide FITC
blank Peroxide FITC	1,04	----	-1,6300*	-9,2200*	-16,800*
0 Peroxide FITC	2,671333333	Ja ($p = 0,02$)	----	-7,5900*	-15,1700*
H Peroxide FITC	10,26	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-7,5800*
P Peroxide FITC	17,84	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----

Granulozyten



Grafik 3.68 : MW und SF der Peroxide in der Granulozytenpopulation



Grafik 3.69 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der Peroxide in der Granulozytenpopulation

3.2.3 Interleukine

3.2.3.1 Ergebnisse Interleukin1 β

Lymphozyten

	Autofluoreszenz	IL1beta FITC NS	IL1beta FITC Leerwert	IL1beta FITC Heparin 120min	IL1beta FITC PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,079	0,211	0,348	1,292	1,878
Std.Fehler des MW	0,003	0,013	0,020	0,097	0,041
Varianz	0,000	0,001	0,002	0,056	0,010
Std.Abweichung	0,008	0,032	0,049	0,238	0,101
Variationskoeffizient	0,101	0,149	0,141	0,184	0,054
Median	0,079	0,200	0,364	1,310	1,835
geom. Mittelwert	0,079	0,209	0,345	1,273	1,876

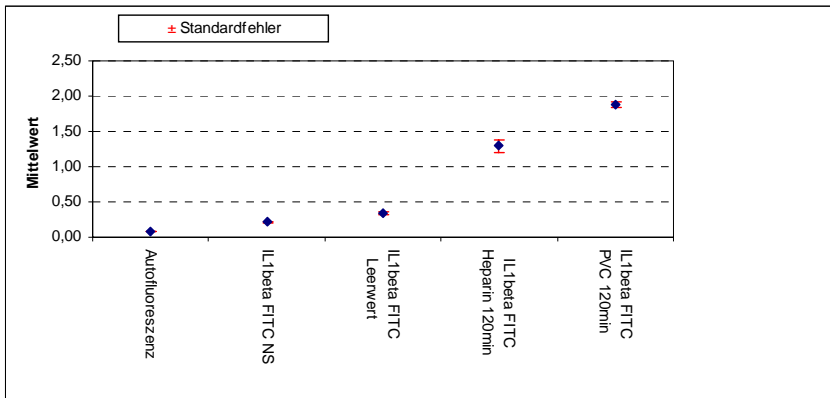
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

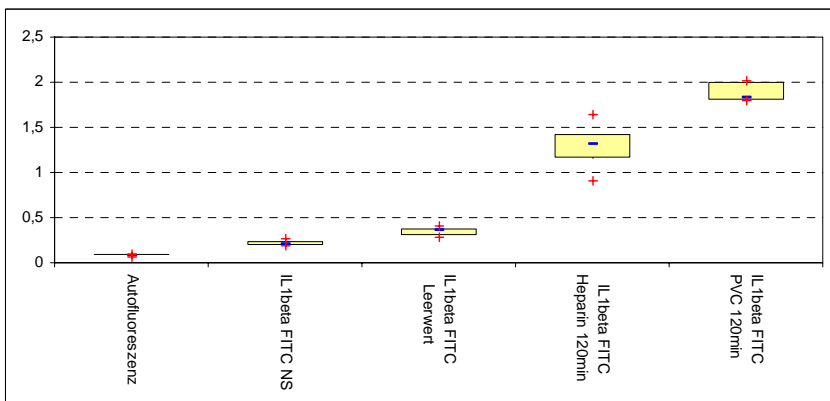
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	IL1beta NS	IL1beta Leerw.	IL1beta Hep. 120min	IL1beta PVC 120min
Auto	0,07945	----	-1,5950E-02	-0,1529	-0,8514*	-1,6834*
IL1beta NS	0,21090	Nein (p=1,0)	----	-0,1369	-0,8354*	-1,6674*
IL1beta Leerw.	0,34790	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-0,6985*	-1,5305*
IL1beta Hep. 120min	1,29233	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p=0,01)	----	-0,8320*
IL1beta PVC 120min	1,87833	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----

Lymphozyten



Grafik 3.70 : MW und SF des Interleukin-1β in der Lymphozytenpopulation



Grafik 3.71 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-], Min./Max [+], 25./95. Perz. [Box]) Interleukin-1β in der Lymphozytenpopulation

Monozyten

	Autofluoreszenz	IL1beta FITC NS	IL1beta FITC Leerwert	IL1beta FITC Heparin 120min	IL1beta FITC PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,341	0,947	2,856	3,290	3,814
Std.Fehler des MW	0,033	0,018	0,056	0,025	0,095
Varianz	0,006	0,002	0,019	0,004	0,054
Std.Abweichung	0,080	0,045	0,136	0,061	0,232
Variationskoeffizient	0,234	0,048	0,048	0,019	0,061
Median	0,320	0,952	2,852	3,285	3,862
geom. Mittelwert	0,334	0,946	2,853	3,290	3,808

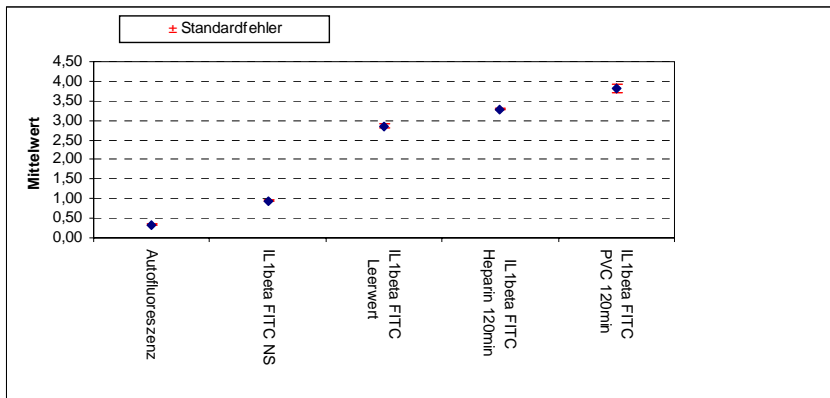
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

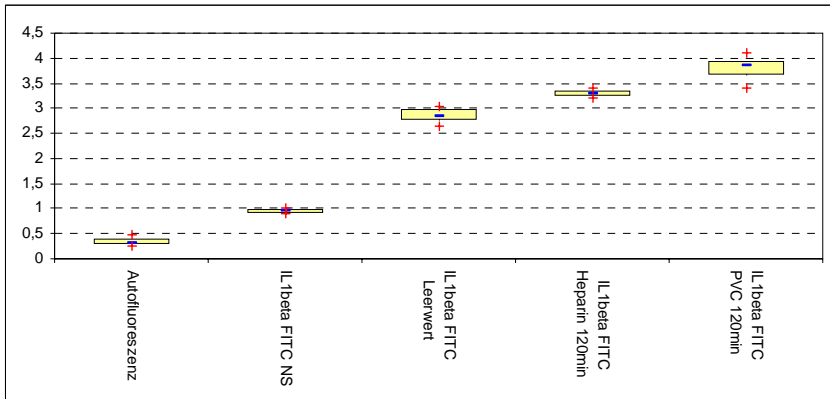
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	IL1beta NS	IL1beta Leerw.	IL1beta Hep. 120min	IL1beta PVC 120min
Auto	0,34100	----	-0,6063*	-2,5145*	-2,9490*	-3,4728*
IL1beta NS	0,94733	Ja ($p < 0,001$)	----	-1,9082*	-2,3427*	-2,8665*
IL1beta Leerw.	2,85550	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-0,4345*	-0,9583*
IL1beta Hep. 120min	3,29000	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-0,5238*
IL1beta PVC 120min	3,81383	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----

Monozyten



Grafik 3.72 : MW und SF des Interleukin-1β in der Monozytenpopulation



Grafik 3.73 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des Interleukin-1 β in der Monozytenpopulation

Granulozyten

	Autofluoreszenz	IL1beta FITC NS	IL1beta FITC Leerwert	IL1beta FITC Heparin 120min	IL1beta FITC PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,787	1,679	30,494	32,977	43,183
Std.Fehler des MW	0,064	0,182	0,473	0,599	0,776
Varianz	0,025	0,198	1,344	2,152	3,614
Std.Abweichung	0,157	0,445	1,159	1,467	1,901
Variationskoeffizient	0,200	0,265	0,038	0,044	0,044
Median	0,785	1,682	30,260	33,300	42,500
geom. Mittelwert	0,773	1,630	30,476	32,949	43,150

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

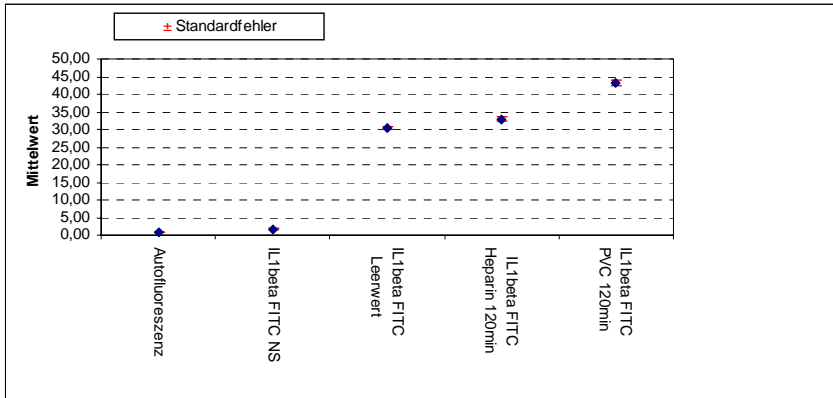
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,008$, Leerwert gegen PVC 120min $p<0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p<0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

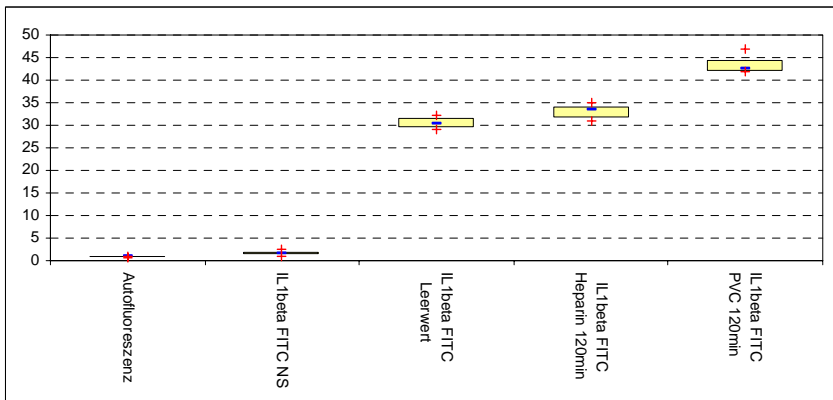
	(Mittelwert)	Auto	IL1beta NS	IL1beta Leerw.	IL1beta Hep. 120min	IL1beta PVC 120min
Auto	0,78667	----	-0,8923	29,7077*	-32,1900*	-42,3967*
IL1beta NS	1,67900	Nein ($p=1,0$)	----	28,8153*	-31,2977*	-41,5043*
IL1beta Leerw.	30,49433	($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	-2,4823*	-12,6890*
IL1beta Hep.	32,97667	Ja	Ja	Nein	----	-10,2067*

120min		(p<0,001)	(p<0,001)	p=0,16)		
IL1beta PVC 120min	43,18333	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----

Granulozyten



Grafik 3.74 : MW und SF des Interleukin-1β in der Granulozytenpopulation



Grafik 3.75 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des Interleukin-1β in der Granulozytenpopulation

3.2.3.2 Ergebnisse Interleukin 2 Lymphozyten

	Autofluoreszenz	IL2 FITC Neg.Staining	IL2 FITC Leerwert	IL2 FITC Heparin 120min	IL2 FITC PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,045	0,271	0,435	0,546	0,474
Std.Fehler des MW	0,003	0,086	0,065	0,068	0,022

Varianz	0,000	0,044	0,025	0,027	0,003
Std.Abweichung	0,007	0,210	0,160	0,166	0,055
Variationskoeffizient	0,149	0,775	0,367	0,303	0,116
Median	0,045	0,165	0,392	0,547	0,459
geom. Mittelwert	0,044	0,208	0,415	0,521	0,471

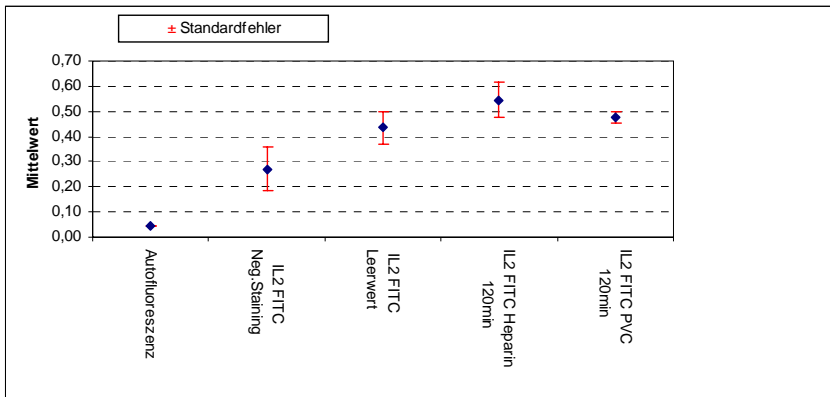
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min p=0,266, Leerwert gegen PVC 120min p=0,586, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min p=0,336. **Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze p=0,05 (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	IL2 NS	IL2 Leerw.	IL2 PVC 120min	IL2 Hep. 120min
Auto	0,04485	----	-0,226	-0,3905*	-0,5012*	-0,4292*
IL2 NS	0,27083	Nein (p=0,105)	----	-0,1645	-0,2752*	-0,2032
IL2 Leerw.	0,43527	Ja (p=0,001)	Nein (p=0,548)	----	-0,1107	-3,8667E-02
IL2 PVC 120min	0,47400	Ja (p<0,001)	Nein (p=0,024)	Nein (p=1,0)	----	7,200E-02
IL2 Hep. 120min	0,54600	Ja (p<0,001)	Nein (p=0,199)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----

Lymphozyten



Grafik 3.76 : MW und SF des Interleukin-2 in der Lymphozytenpopulation

Monozyten

	Autofluoreszenz	IL2 FITC Neg.Staining	IL2 FITC Leerwert	IL2 FITC Heparin 120min	IL2 FITC PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000

Mittelwert	0,294	0,877	1,315	1,431	1,611
Std.Fehler des MW	0,052	0,021	0,012	0,013	0,011
Varianz	0,016	0,003	0,001	0,001	0,001
Std.Abweichung	0,128	0,052	0,030	0,032	0,028
Variationskoeffizient	0,435	0,059	0,023	0,022	0,017
Median	0,250	0,857	1,310	1,435	1,615
geom. Mittelwert	0,272	0,876	1,315	1,431	1,611

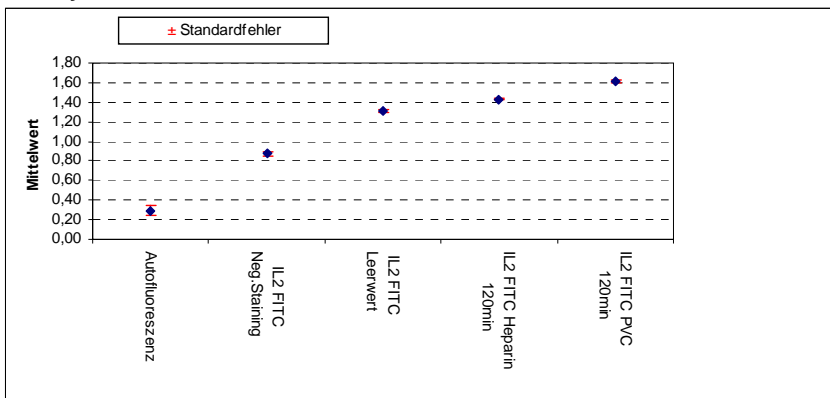
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,008$, Leerwert gegen PVC 120min $p<0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p<0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

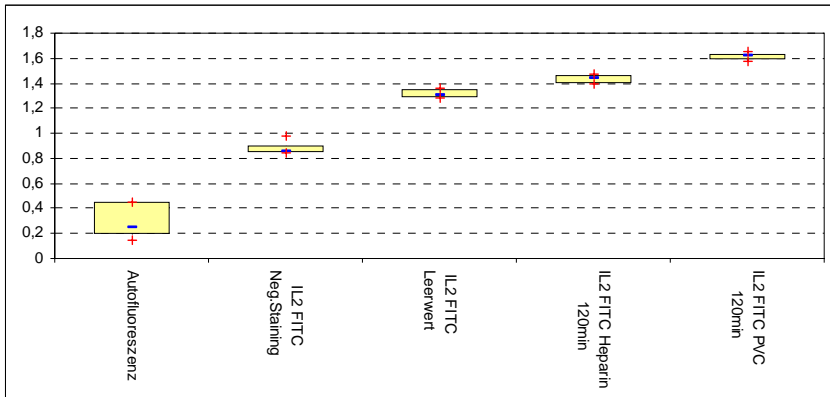
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	IL2 NS	IL2 Leerw.	IL2 Hep. 120min	IL2 PVC 120min
Auto	0,29400	----	-0,5833*	-1,0210*	-1,1374*	-1,3168*
IL2 NS	0,87733	Ja ($p<0,001$)	----	-0,4377	-0,5541*	-0,7335*
IL2 Leerw.	1,31500	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	-0,1164	-0,2958*
IL2 Hep. 120min	1,43143	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=0,053$)	----	-0,1794*
IL2 PVC 120min	1,61094	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----

Monozyten



Grafik 3.77 : MW und SF des Interleukin-2 in der Monozytenpopulation



Grafik 3.78 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des Interleukin-2 in der Monozytenpopulation

Granulozyten

	Autofluoreszenz	IL2 FITC Neg.Staining	IL2 FITC Leerwert	IL2 FITC Heparin 120min	IL2 FITC PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	1,651	2,618	3,321	3,292	3,457
Std.Fehler des MW	0,078	0,064	0,054	0,055	0,103
Varianz	0,037	0,025	0,018	0,018	0,064
Std.Abweichung	0,192	0,158	0,133	0,134	0,253
Variationskoeffizient	0,116	0,060	0,040	0,041	0,073
Median	1,628	2,625	3,313	3,352	3,575
geom. Mittelwert	1,642	2,614	3,319	3,289	3,449

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

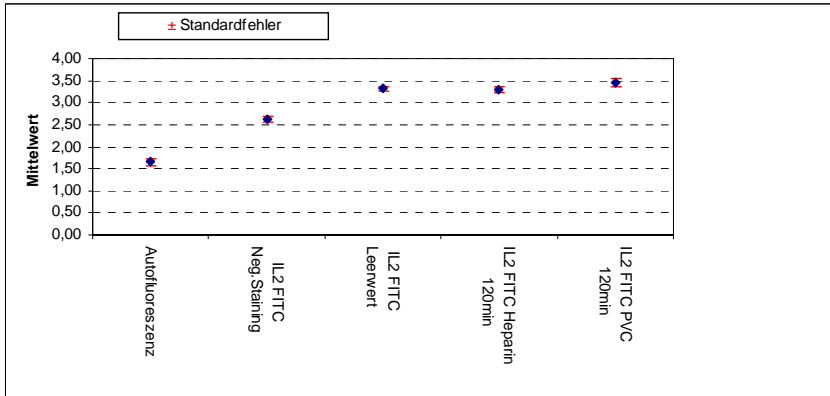
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,71$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,273$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,187$. **Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	IL2 NS	IL2 Hep. 120min	IL2 Leerw.	IL2 PVC 120min
Auto	1,65137	----	-0,9708*	-1,6715*	-1,6408*	-1,8070*
IL2 NS	2,61762	Ja ($p<0,001$)	----	-0,7007*	-6700*	-0,8362*
IL2 Hep. 120min	3,29168	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	3,027E-02	-0,1355
IL2 Leerw.	3,32133	Ja	Ja	Nein	----	-0,1662

		(p<0,001)	(p<0,001)	(p=1,0)		
		Ja	Ja	Nein		
IL2 PVC 120min	3,45680	(p<0,001)	(p<0,001)	(p=1,0)	Nein (p=1,0)	----

Granulozyten



Grafik 3.79 : MW und SF des Interleukin-2 in der Granulozytenpopulation

3.2.3.3 Ergebnisse TNF- α

Lymphozyten

	Autofluoreszenz	IL TNF-alpha FITC Neg.Staining	IL TNF-alpha FITC Leerwert	IL TNF-alpha FITC Heparin 120min	IL TNF-alpha FITC PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,160	0,306	0,511	0,539	0,621
Std.Fehler des MW	0,004	0,024	0,005	0,003	0,010
Varianz	0,000	0,004	0,000	0,000	0,001
Std.Abweichung	0,010	0,059	0,011	0,007	0,025
Variationskoeffizient	0,062	0,194	0,022	0,013	0,040
Median	0,165	0,305	0,508	0,540	0,630
geom. Mittelwert	0,160	0,302	0,511	0,539	0,621

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

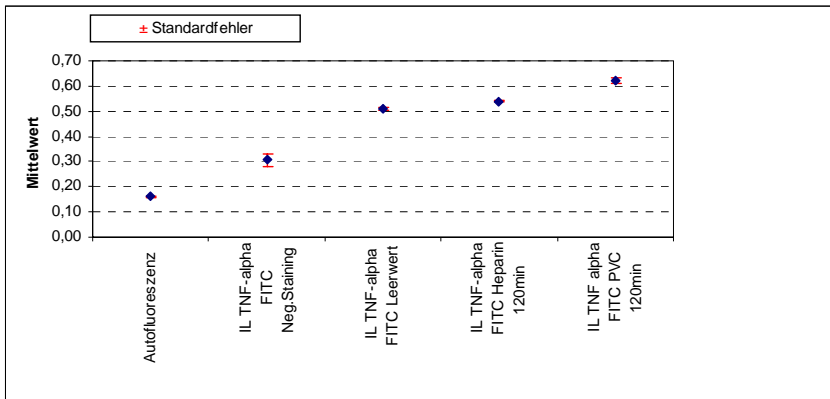
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min p<0,001, Leerwert gegen PVC 120min p<0,001, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min p<0,001. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze p=0,05 (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	IL TNF-alpha NS	IL TNF-alpha	IL TNF-alpha	IL TNF-alpha PVC
--	--------------	------	-----------------	--------------	--------------	------------------

				Leerw.	Hep. 120min	120min
Auto	0,1602	----	-0,1463*	-0,3505*	-0,3785*	-0,4612*
IL TNF-alpha NS	0,3064	Ja (p<0,001)	----	-0,2042*	-0,2322*	-0,3148*
IL TNF-alpha Leerw.	0,5107	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----	-2,80E-02	-0,1107*
IL TNF-alpha Hep. 120min	0,5387	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Nein (p=1,0)	----	-8,2667E-02
IL TNF alpha PVC 120min	0,6213	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p=0,001)	----

Lymphozyten



Grafik 3.80 : MW und SF des TNF- α in der Lymphozytenpopulation

Monozyten

	Autofluoreszenz	IL TNF-alpha FITC Neg.Staining	IL TNF- alpha FITC Leerwert	IL TNF- alpha FITC Heparin 120min	IL TNF alpha FITC PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,557	0,443	1,566	1,470	1,463
Std.Fehler des MW	0,058	0,044	0,018	0,027	0,013
Varianz	0,020	0,012	0,002	0,005	0,001
Std.Abweichung	0,142	0,107	0,043	0,067	0,031
Variationskoeffizient	0,255	0,242	0,028	0,046	0,022
Median	0,586	0,454	1,554	1,473	1,469
geom. Mittelwert	0,540	0,432	1,566	1,468	1,462

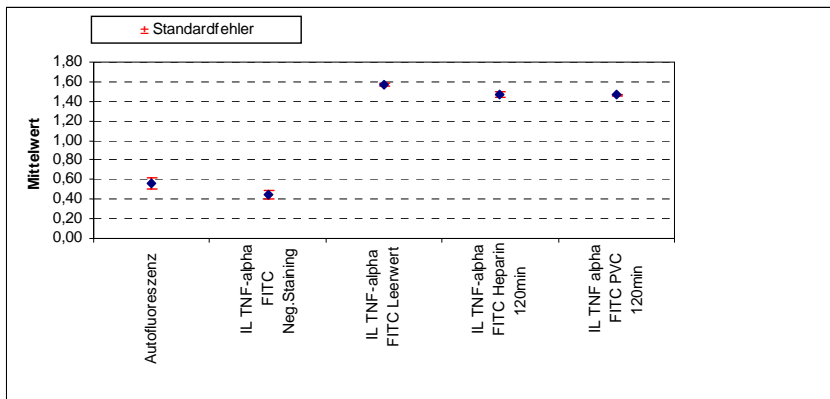
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min p=0,0143, Leerwert gegen PVC 120min p=0,007, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min p=0,882. **Es besteht ein signifikanter Unterschied zw. dem Leerwert und heparinbeschichtetem PVC 120min, sowie ein hochsignifikanter Unterschied zw. dem Leerwert und PVC 120min.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	Mittelw.	Auto	NS	TNF alpha Leerw. 120min	TNF-alpha Hep. 120min	TNF-alpha PVC.
Auto	0,5574	----	0,1143	-1,0088*	-0,9122*	-0,9053*
TNF alpha NS	0,4432	Nein ($p=0,344$)	----	-1,1232*	-1,0265*	-1,0197*
TNF alpha Leerw. 120min	1,5666	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	9,667E-02	0,1035
TNF-alpha Hep. 120min	1,4697	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=0,7029$)	----	6,833E-03
TNF-alpha PVC 120min.	1,4627	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=0,537$)	Nein ($p=1,0$)	----

Monozyten



Grafik 3.81 : MW und SF des TNF- α in der Monozytenpopulation

Granulozyten

	Autofluoreszenz	IL TNF-alpha FITC Neg.Staining	IL TNF- alpha FITC Leerwert	IL TNF- alpha FITC Heparin 120min	IL TNF alpha FITC PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,456	2,137	3,578	3,688	4,177
Std.Fehler des MW	0,050	0,194	0,036	0,084	0,029
Varianz	0,015	0,226	0,008	0,042	0,005
Std.Abweichung	0,122	0,475	0,088	0,205	0,072
Variationskoeffizient	0,268	0,222	0,024	0,055	0,017
Median	0,417	2,200	3,595	3,780	4,170
geom. Mittelwert	0,443	2,088	3,577	3,683	4,176

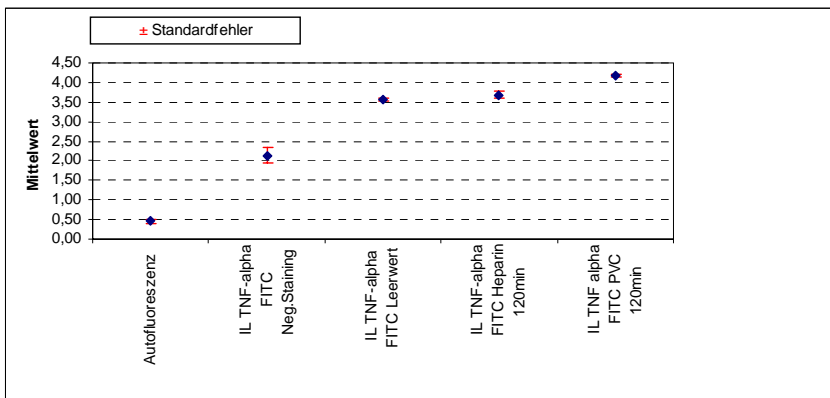
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,254$, Leerwert gegen PVC 120min $p<0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p<0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede zwischen dem Leerwert und PVC120min, sowie zw. beiden 120min-Werten.**

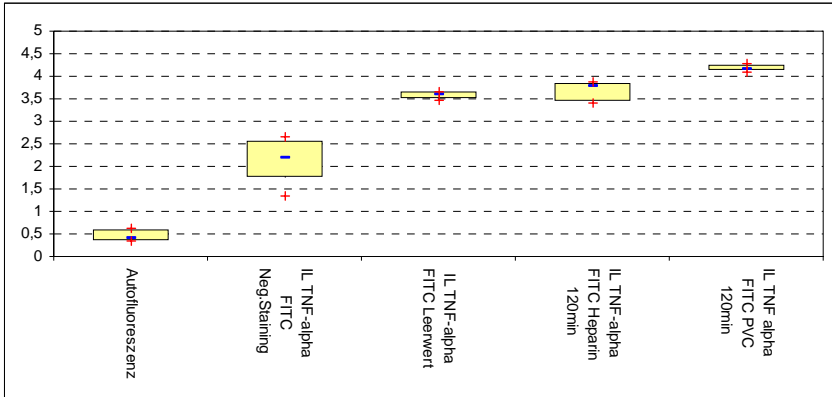
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	TNF-alpha NS	TNF-alpha Leerw.	TNF-alpha Hep. 120min	TNF alpha PVC 120min
Auto	0,45617	----	-1,6812*	-3,1222*	-3,2322*	-3,7205*
TNF-alpha NS	2,13733	Ja ($p<0,001$)	----	-1,4410*	-1,5510*	-2,0393*
TNF-alpha Leerw.	3,57833	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	-0,1100	-0,5983*
TNF-alpha Hep. 120min	3,68833	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=1,0$)	Nein ($p=1,0$)	----	0,4883*
TNF alpha PVC 120min	4,17667	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p=0,003$)	Ja ($p=0,019$)	Ja ($p=0,019$)	----

Granulozyten



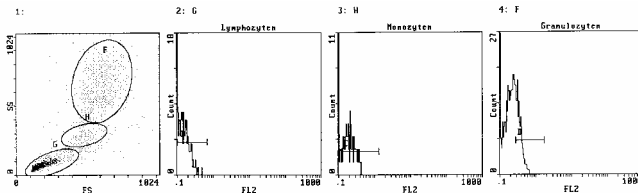
Grafik 3.82 : MW und SF des TNF- α in der Granulozytenpopulation



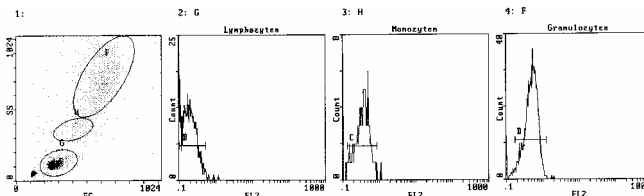
Grafik 3.83 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des TNF- α in der Granulozytenpopulation

3.2.4 HeatShock

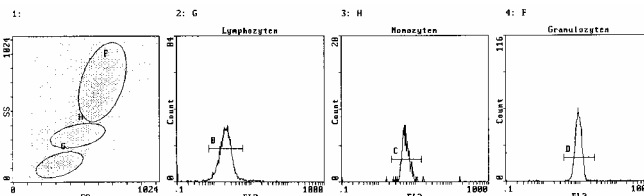
3.2.4.1 Meßergebnisse optisch



HeatShock 2 Stunden Loop – Autofluoreszenz



Heat Shock 2 Stunden Loop – Negative Staining / Isotypkontrolle



HeatShock 2 Stunden Loop – Leerwert (0)

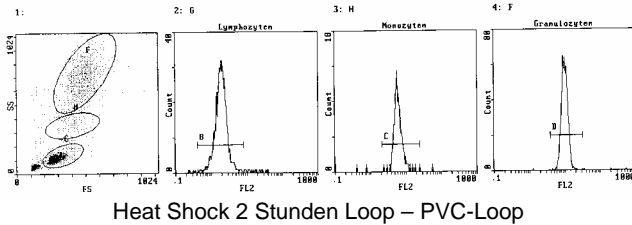
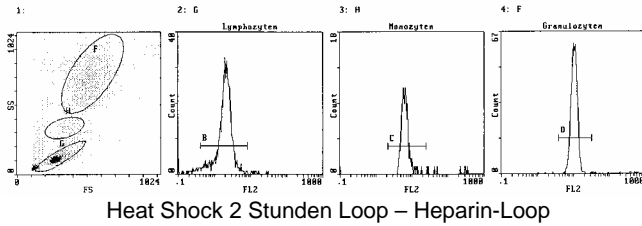


Abb. 3.17 : Optisches Messergebnis HeatShock Protein HSP 70

3.2.4.2 Ergebnisse HeatShock

FITC Gesamt

	Neg. Staining	Autofluoreszenz	Leerwert	120min Heparin	120 min PVC
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,238	1,202	16,683	20,167	21,575
Std.Fehler des MW	0,069	0,082	0,344	0,380	0,185
Varianz	0,029	0,041	0,710	0,867	0,206
Std.Abweichung	0,170	0,202	0,842	0,931	0,454
Variationskoeffizient	0,713	0,168	0,050	0,046	0,021
Median	0,180	1,125	16,950	20,000	21,775
geom. Mittelwert	0,189	1,189	16,665	20,149	21,571

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen Heparin 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$. Heparin 120min gegen PVC 120min $p = 0,007$.

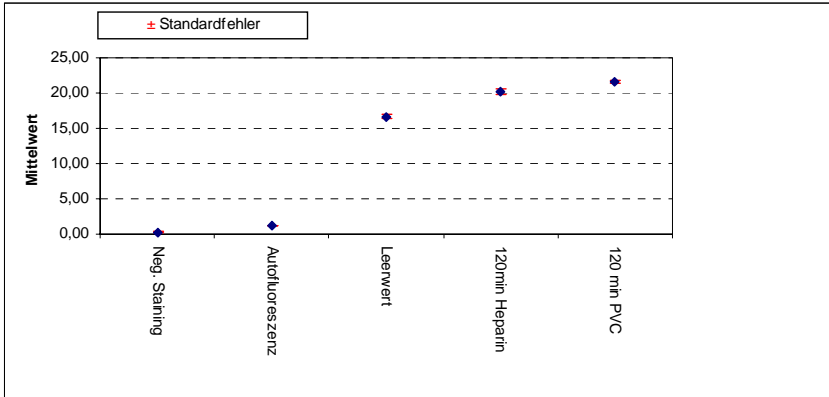
Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

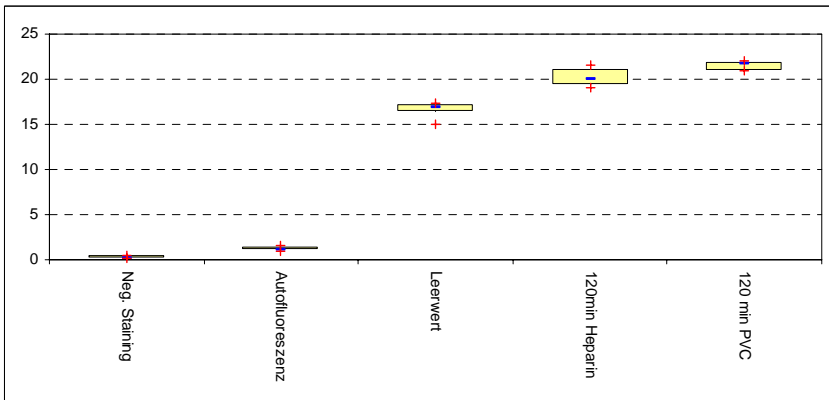
	(Mittelwert)	Auto Gran.	Negative Staining Gran.	Leerw. Gran.	120 min Hep. Gran.	120min PVC Gran.
Auto Gran.	1,202	----	-0,9640	16,4457*	-19,9290*	21,3373*
Negative Staining Gran.	0,238	Nein ($p = 0,111$)	----	15,4817*	-18,965*	20,3733*
Leerw. Gran.	16,683	Ja	Ja	----	-3,4833*	-4,8917*

		(p<0,001)	(p<0,001)			
120 min Hep. Gran.	20,167	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----	-1,4083*
120min PVC Gran.	32,565	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p=0,005)	----

FITC Gesamt



Grafik 3.84 : MW und SF des FITC-Gesamtsignals des HeatShock 70-Antikörpers über alle Leukozytenpopulationen hinweg. Ansteigende Werte gegenüber Autofl. und NS. Geringe Anstiege zwischen Leerwert und den beiden Schlauchtypen.



Grafik 3.85 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-], Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) des FITC-Gesamtsignals des HeatShock 70-Antikörpers über alle Leukozytenpopulationen hinweg. Ansteigende Werte gegenüber Autofl. und NS. Geringe Anstiege zwischen Leerwert und den beiden Schlauchtypen.

Lymphozyten

	Negative Staining Ly.	Autofluoreszenz Ly.	Leerwert Ly.	120min Heparin Ly.	120 min PVC Ly.

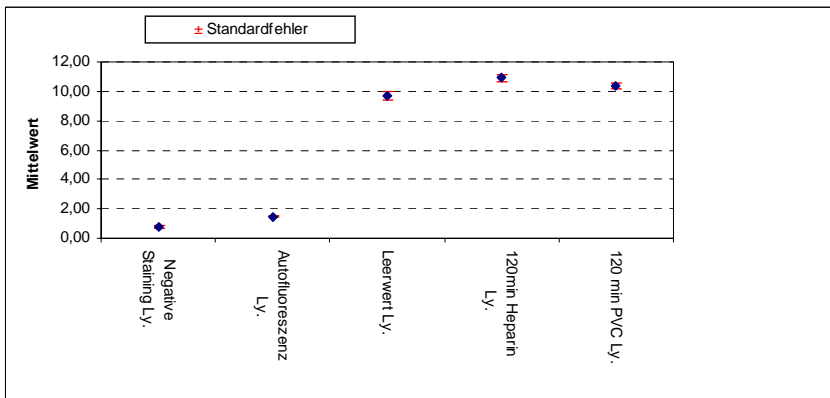
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,762	1,468	9,720	10,925	10,400
Std.Fehler des MW	0,137	0,028	0,277	0,224	0,181
Varianz	0,112	0,005	0,460	0,300	0,196
Std.Abweichung	0,335	0,068	0,678	0,547	0,443
Variationskoeffizient	0,439	0,046	0,070	0,050	0,043
Median	0,855	1,480	9,905	11,100	10,400
geom. Mittelwert	0,610	1,467	9,700	10,913	10,392

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,0069$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,066$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,977$. **Es besteht ein hochsignifikanter Unterschied zw. dem Leerwert und heparinbeschichtetem PVC 120min.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto Gran.	Negative Staining Gran.	Leerw. Gran.	120 min Hep. Gran.	120min PVC Gran.
Auto Gran.	1,468	----	-0,7067	-8,9583*	-10,1366*	-
Negative Staining Gran.	0,762	Nein ($p=0,140$)	----	-8,2517*	-9,4567*	8,9317*
Leerw. Gran.	9,720	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	-1,2050*	-0,680
120 min Hep. Gran.	10,925	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	----	0,5250
120min PVC Gran.	10,4	Ja ($p<0,001$)	Ja ($p<0,001$)	Nein ($p=0,176$)	Nein ($p=0,608$)	----



Grafik 3.86 : MW und SF der HeatShock 70 MeanFluorescence in der Lymphozytenpopulation. Anstiege geg. Autofl. und NS, ebenfalls ansteigender Wert zw. Leerwert und Heparinbeschichtung, leichtes Absinken im PVC-Schlauch geg. Leerwert.

Monozyten

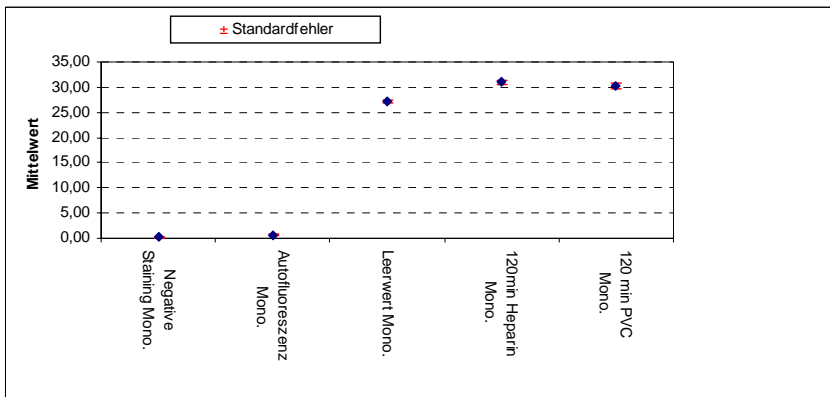
	Negative Staining Mono.	Autofluoreszenz Mono.	Leerwert Mono.	120min Heparin Mono.	120 min PVC Mono.
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,157	0,679	27,200	30,978	30,250
Std.Fehler des MW	0,058	0,032	0,268	0,499	0,659
Varianz	0,020	0,006	0,432	1,492	2,603
Std.Abweichung	0,141	0,079	0,657	1,222	1,613
Variationskoeffizient	0,898	0,116	0,024	0,039	0,053
Median	0,095	0,685	27,150	30,750	30,150
geom. Mittelwert	0,125	0,675	27,193	30,959	30,215

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

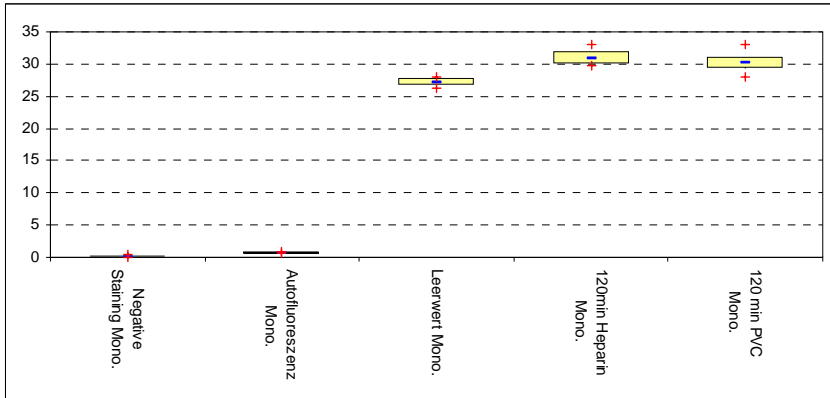
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p = 0,398$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede zwischen dem Leerwert und heparinbeschichtetem PVC 120min bzw. PVC 120min.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto Gran.	Negative Staining Gran.	Leerw. Gran.	120 min Hep. Gran.	120min PVC Gran.
Auto Gran.	0,679	----	-0,5217	27,0426*	-30,7376*	30,0926*
Negative Staining Gran.	0,157	Nein ($p = 1,0$)	----	26,5208*	-30,2158*	29,5708*
Leerw. Gran.	27,2	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-3,6950*	-3,0500*
120 min Hep. Gran.	30,978	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	0,6450
120min PVC Gran.	30,250	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Nein ($p = 1,0$)	----



Grafik 3.87 : MW und SF der HeatShock 70 MeanFluorescence in der Monozytenpopulation. Anstiege geg. Autofl. und NS, ebenfalls ansteigender Wert zw. Leerwert und Heparinbeschichtung, leichtes Absinken im PVC-Schlauch geg. Leerwert.



Grafik 3.88 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der HeatShock 70 MeanFluorescence in der Monozytenpopulation Anstiege geg. Autofl. und NS, ebenfalls ansteigender Wert zw. Leerwert und Heparinbeschichtung, leichtes Absinken im PVC-Schlauch geg. Leerwert.

Granulozyten

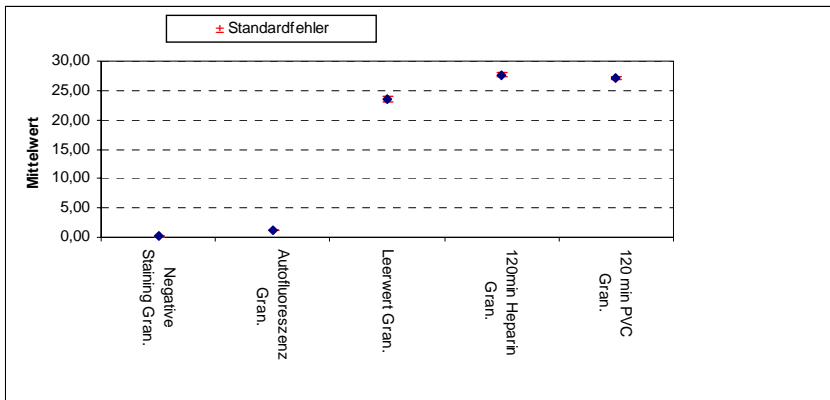
	Negative Staining Gran.	Autofluoreszenz Gran.	Leerwert Gran.	120min Heparin Gran.	120 min PVC Gran.
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,128	1,180	23,517	27,708	27,133
Std.Fehler des MW	0,029	0,034	0,432	0,254	0,286
Varianz	0,005	0,007	1,122	0,386	0,491
Std.Abweichung	0,072	0,083	1,059	0,622	0,700
Variationskoeffizient	0,560	0,071	0,045	0,022	0,026
Median	0,095	1,170	23,500	27,700	27,300
geom. Mittelwert	0,114	1,178	23,497	27,703	27,126

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

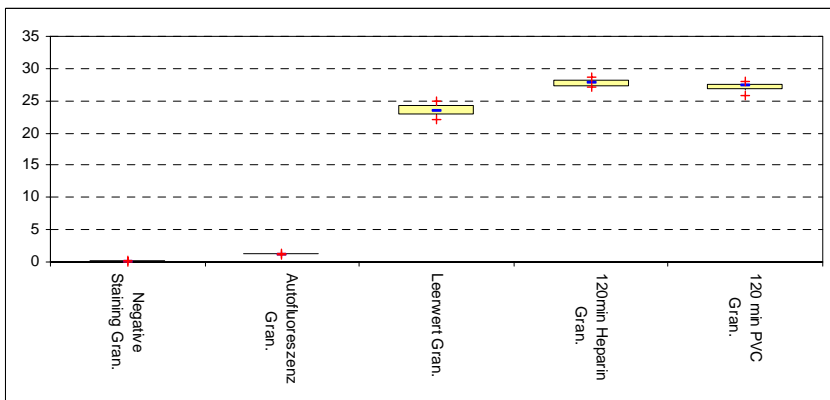
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p = 0,164$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede zwischen dem Leerwert und heparinbeschichtetem PVC 120min, sowie zwischen dem Leerwert und PVC 120min.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto Gran.	Negative Staining Gran.	Leerw. Gran.	120 min Hep. Gran.	120min PVC Gran.
Auto Gran.	1,180	----	-1,0520	-	-27,5803*	26,9881*
Negative Staining Gran.	0,128	Nein (p=0,08)	----	-22,3367	-26,5283*	25,9367*
Leerw. Gran.	23,517	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----	-4,1917*	-3,600*
120 min Hep. Gran.	27,708	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----	0,5917
120min PVC Gran.	27,133	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Nein (p=1,0)	----



Grafik 3.89 : MW und SF der HeatShock 70 MeanFluorescence in der Granulozytenpopulation . Anstiege geg. Autofl. und NS, ebenfalls ansteigender Wert zw. Leerwert und Heparinbeschichtung, leichtes Absinken im PVC-Schlauch geg. Leerwert.



Grafik 3.90 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der HeatShock 70 MeanFluorescence in der Granulozytenpopulation Anstiege geg.

Autofl. und NS, ebenfalls ansteigender Wert zw. Leerwert und Heparinbeschichtung, leichtes Absinken im PVC-Schlauch geg. Leerwert.

3.2.5 Thrombozytenstudien

3.2.5.1 CD41 FITC an Thrombozyten

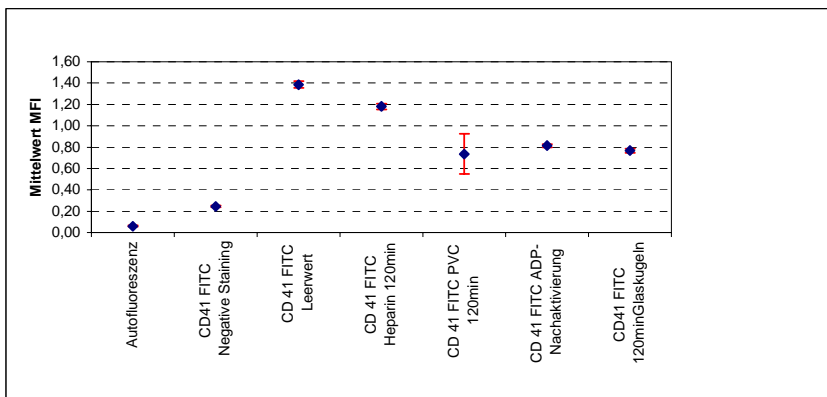
	Auto- fluores- zenz	CD41 FITC Negative Staining	CD 41 FITC Leerwert	CD 41 FITC Heparin 120min	CD 41 FITC PVC 120min	CD 41 FITC ADP-Nach- aktivierung	CD41 FITC 120minGlas- kugeln
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,060	0,245	1,386	1,181	0,736	0,814	0,766
Std.Fehler des MW	0,006	0,010	0,032	0,028	0,187	0,015	0,018
Varianz	0,000	0,001	0,006	0,005	0,209	0,001	0,002
Std.Abweichung	0,015	0,025	0,077	0,068	0,457	0,036	0,044
Variationskoeffizient	0,243	0,100	0,056	0,057	0,621	0,044	0,057
Median	0,067	0,253	1,355	1,163	0,927	0,814	0,750
geom. Mittelwert	0,058	0,244	1,385	1,180	0,504	0,813	0,765

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,0016$, Leerwert gegen PVC 120min $p = 0,006$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p = 0,040$, Leerwert gegen ADP-Aktivierung 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen Glaskugeln 120min $p < 0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen, außer zw. heparinbeschichtetem PVC 120min und PVC120min (signifikant)**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittel- wert)	Auto	CD41 NS	CD 41 Leerw.	CD41 Hep. 120min	CD 41 PVC 120min	CD 41 Hep. 120min	CD 41 120minGlas
Auto	0,06	----	-0,1849	-1,3261*	-1,1210*	-	-0,7536*	-0,7060*
CD41 NS	0,245	Nein ($p = 1,0$)	----	-1,1412*	-0,9361*	0,4909*	-0,5686*	-0,5210*
CD 41 Leerw.	1,386	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	0,2051	0,6502*	0,572533*	0,6201*
CD41 Hep. 120min	1,181	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Nein ($p = 1,0$)	----	0,4451*	0,36743*	0,4150*
CD 41 PVC 120min	0,736	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p = 0,003$)	----	-7,77e-02	-3,011e-02
CD 41 Hep. 120min	0,814	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p = 0,023$)	Nein ($p = 1,0$)	----	4,7616e-02
CD 41 120minGlas	0,766	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p = 0,006$)	Nein ($p = 1,0$)	Nein ($p = 1,0$)	----



Grafik 3.91 : MW und SF der CD41 MeanFluorescence in der Thrombozytenpopulation. Anstiege geg. Autofl. und NS, abfallende Werte gegenüber dem Leerwert für PVC- und Heparinschlauch, ebenso für Nachaktivierung und Glaskugel-Aktivierung.

3.2.5.2 Thrombozytenadhäsion an Leukozyten

Lymphozyten

	Autofluoreszenz	CD41 Negative Staining	CD41 FITC Leerwert	CD41 FITC Heparin 120min	CD41 FITC PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,504	1,562	11,667	15,500	17,583
Std.Fehler des MW	0,049	0,048	0,422	0,428	0,583
Varianz	0,014	0,014	1,067	1,100	2,042
Std.Abweichung	0,120	0,119	1,033	1,049	1,429
Variationskoeffizient	0,238	0,076	0,089	0,068	0,081
Median	0,557	1,551	12,000	15,500	17,500
geom. Mittelwert	0,491	1,558	11,627	15,470	17,536

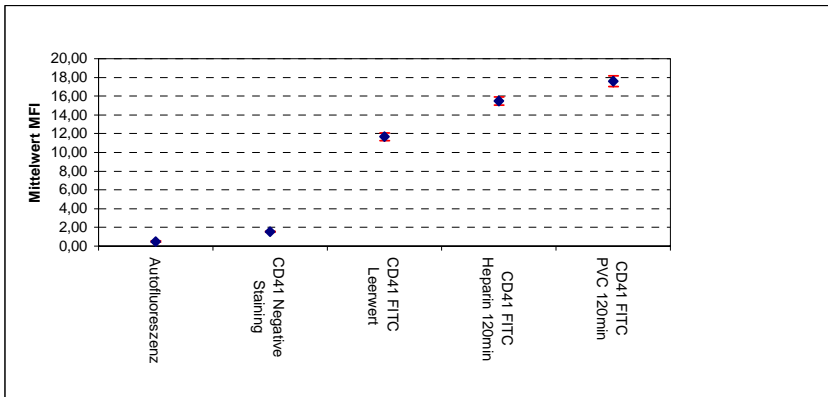
Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p = 0,016$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen, außer zw. heparinbeschichtetem PVC 120min und PVC120min (signifikant)**

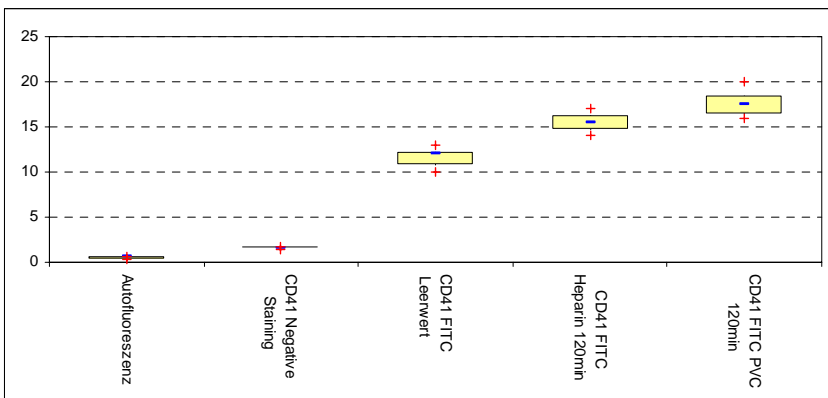
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	CD41 Negative Staining	CD41 FITC Leerwert	CD41 FITC Heparin 120min	CD41 FITC PVC 120min

Auto	0,504	----	-1,0559	-	-14,996*	-17,079*
CD41 NS	1,562	Nein (p=0,580)	----	-	-13,939*	-16,023*
CD41 Leerwert	11,667	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----	-3,8333*	-5,9166*
CD41 Heparin 120min	15,500	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----	-2,0833
CD41 PVC 120min	17,583	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p=0,006)	----



Grafik 3.92 : MW und SF der CD41 MeanFluorescence bei Beobachtung in der Lymphozytenpopulation. Zunehmende Anheftung von CD41-pos. Thrombozyten an Lymphozyten (Heparinbeschichtung < PVC)



Grafik 3.93 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der CD41 MeanFluorescence bei Beobachtung in der Lymphozytenpopulation. Zunehmende Anheftung von CD41-pos. Thrombozyten an Lymphozyten (Heparinbeschichtung < PVC)

Granulozyten

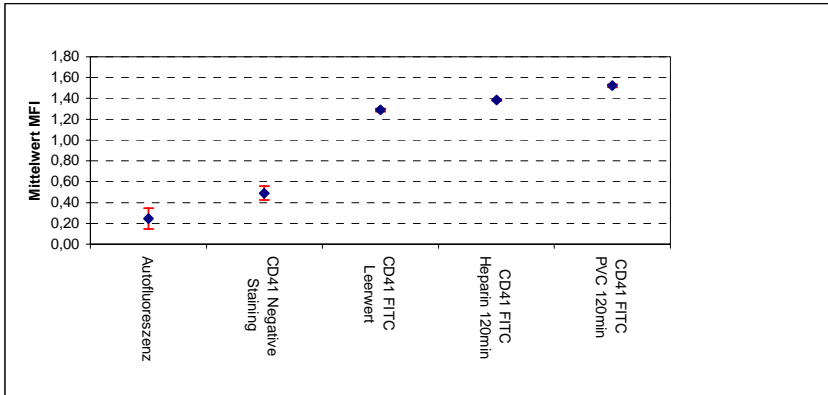
	Autofluoreszenz	CD41 Negative Staining	CD41 FITC Leerwert	CD41 FITC Heparin 120min	CD41 FITC PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,247	0,490	1,288	1,385	1,522
Std.Fehler des MW	0,099	0,066	0,016	0,008	0,016
Varianz	0,058	0,026	0,002	0,000	0,002
Std.Abweichung	0,241	0,162	0,039	0,021	0,039
Variationskoeffizient	0,977	0,330	0,030	0,015	0,026
Median	0,222	0,400	1,290	1,395	1,505
geom. Mittelwert	0,116	0,472	1,288	1,385	1,521

Keine Ausreißer im Datenbestand. Alle Wertereihen sind normalverteilt.

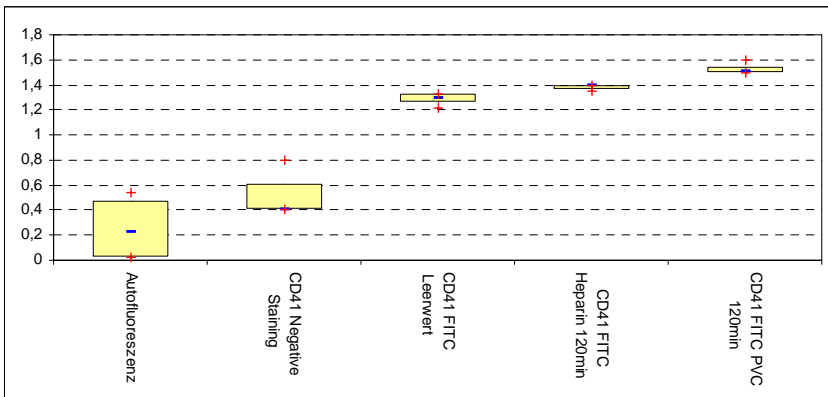
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p = 0,016$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Autofluoreszenz	CD41 Negative Staining	CD41 FITC Leerwert	CD41 FITC Heparin 120min	CD41 FITC PVC 120min
Autofluoreszenz	0,2470	----	-0,2429*	-1,0413*	1,13796*	-1,2746*
CD41 Negative Staining	0,4900	Ja ($p = 0,040$)	----	-0,7983*	-0,8950*	-1,0317*
CD41 FITC Leerwert	1,2883	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-9,66e-02	-0,2333
CD41 FITC Heparin 120min	1,3850	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Nein ($p = 1,0$)	----	-0,13667
CD41 FITC PVC 120min	1,5217	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Nein ($p = 0,054$)	Nein ($p = 0,864$)	----



Grafik 3.94 : MW und SF der CD41 MeanFluorescence bei Beobachtung in der Granulozytenpopulation. Gering zunehmende Anheftung von CD41-pos. Thrombozyten an Granulozyten (Heparinbeschichtung < PVC)



Grafik 4.95 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der CD41 MeanFluorescence bei Beobachtung in der Granulozytenpopulation. Gering zunehmende Anheftung von CD41-pos. Thrombozyten an Granulozyten (Heparinbeschichtung < PVC)

3.2.5.3 Fibrinogenadhäsion an Leukozyten (monoklonaler Antikörper)

Granulozyten

	Autofluoreszenz	Fibrinogen PE Negative Staining	Fibrinogen mono. PE Leerwert	Fibrinogen mono. PE Heparin 120min	Fibrinogen mono. PE PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,058	0,410	3,517	4,958	7,018

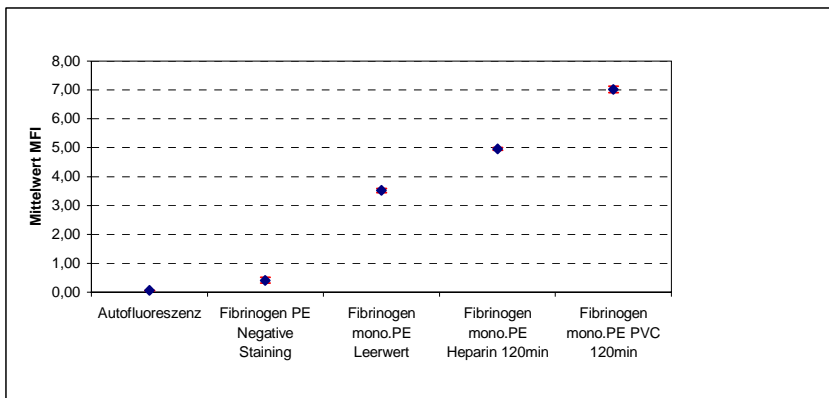
Std.Fehler des MW	0,006	0,105	0,070	0,042	0,113
Varianz	0,000	0,066	0,030	0,010	0,076
Std.Abweichung	0,015	0,258	0,172	0,102	0,276
Variationskoeffizient	0,259	0,629	0,049	0,021	0,039
Median	0,061	0,400	3,500	4,975	6,975
geom. Mittelwert	0,056	0,336	3,513	4,957	7,014

Keine Ausreißer, alle Wertereihen sind normalverteilt.

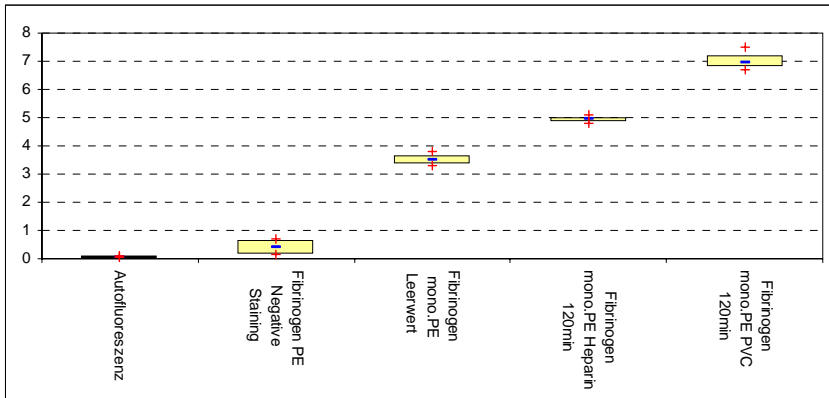
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	Fibrinogen PE Negative Staining	Fibrinogen mono. PE Leerwert	Fibrinogen mono. PE Heparin 120min	Fibrinogen mono. PE PVC 120min
Autofluoreszenz	0,05822	----	-0,3513*	-3,4585*	-4,900*	-6,9601*
Fibrinogen PE NS	0,40958	Ja ($p = 0,039$)	----	-3,1070*	-4,5488*	-6,60875*
Fibrinogen mono. Leerw.	3,51667	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-1,4417*	-3,50167*
Fibrinogen mono. PE Hep.	4,95833	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-2,0600*
Fibrinogen mono. PE PVC	7,01833	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----



Grafik 3.96 : MW und SF der Mean Fluorescence des monoklonalen Fibrinogen-Antikörpers bei Beobachtung der Granulozytenpopulation. Zunehmende Anheftung von PE-markiertem Fibrinogen an Granulozyten (Leerwert < Heparinbeschichtung < PVC)



Grafik 3.97 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der Mean Fluorescence des monoklonalen Fibrinogen-Antikörpers bei Beobachtung der Granulozytenpopulation. Zunehmende Anheftung von PE-markiertem Fibrinogen an Granulozyten (Leerwert < Heparinbeschichtung < PVC)

3.2.5.4 Fibrinogenadhäsion an Leukozyten (polyklonaler Antikörper)

Monozyten

	Autofluoreszenz	Fibrinogen PE Negative Staining	Fibrinogen poly.PE Leerwert	Fibrinogen poly.PE Heparin 120min	Fibrinogen poly.PE PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,064	1,486	5,290	6,510	5,863
Std.Fehler des MW	0,008	0,134	0,059	0,105	0,043
Varianz	0,000	0,108	0,021	0,066	0,011
Std.Abweichung	0,020	0,329	0,145	0,258	0,106
Variationskoeffizient	0,305	0,221	0,027	0,040	0,018
Median	0,061	1,607	5,300	6,575	5,870
geom. Mittelwert	0,062	1,453	5,288	6,506	5,863

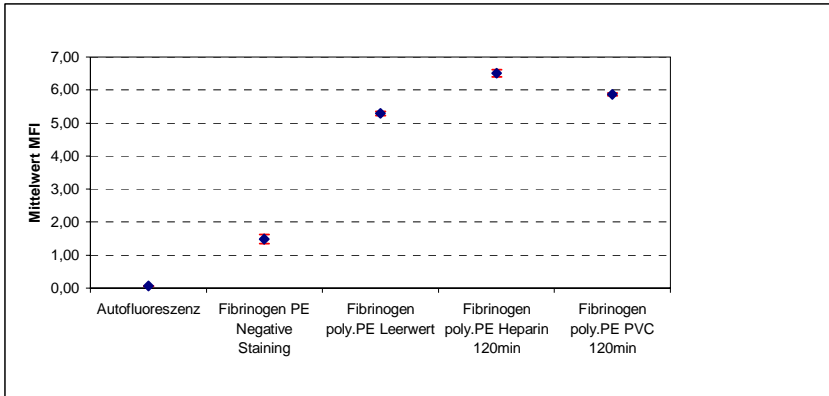
Keine Ausreißer, alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

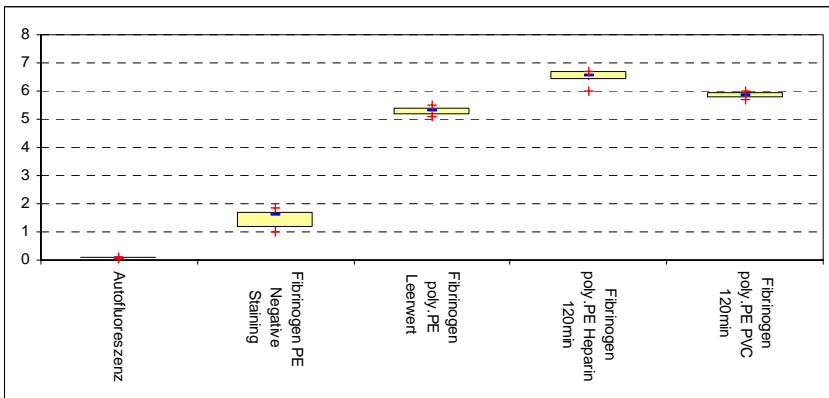
Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	Fibrinogen NS	Fibrinogen poly Leerw.	Fibrinogen poly.PVC 120min	Fibrinogen poly. Hep.120min

Auto	0,06407	----	-1,4236*	-5,2271*	-6,447*	-5,800*
Fibrinogen NS	1,48640	Ja (p<0,001)	----	-3,8036*	-5,0236*	-4,3769*
Fibrinogen poly Leerw.	5,29000	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----	-1,2200*	-0,5733*
Fibrinogen poly.PVC 120min	5,86333	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----	0,6467*
Fibrinogen poly. Hep.120min	6,51000	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----



Grafik 3.98 : MW und SF der MeanFluorescence des polyklonalen Fibrinogen-Antikörpers bei Beobachtung der Monozytenpopulation. Zunehmende Anheftung von PE-markiertem Fibrinogen an Monozyten bei Heparinbeschichtung, schwächer ausgeprägt bei PVC.



Grafik 3.99 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der MeanFluorescence des polyklonalen Fibrinogen-Antikörpers bei Beobachtung der Monozytenpopulation. Zunehmende Anheftung von PE-markiertem Fibrinogen an Monozyten bei Heparinbeschichtung, schwächer ausgeprägt bei PVC.

Granulozyten

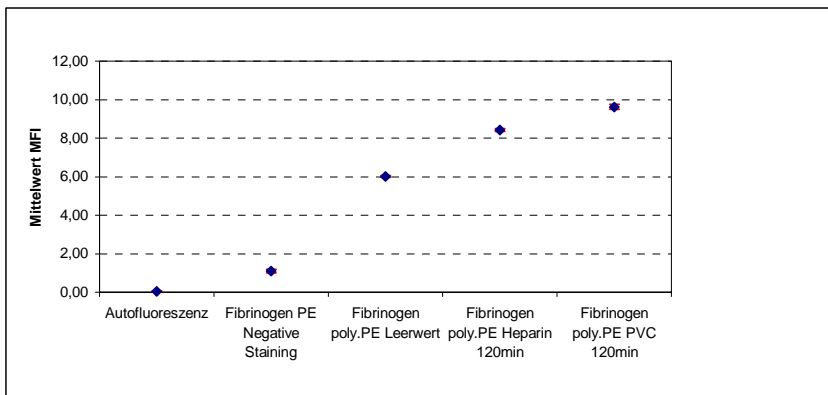
	Autofluoreszenz	Fibrinogen PE Negative Staining	Fibrinogen poly.PE Leerwert	Fibrinogen poly.PE Heparin 120min	Fibrinogen poly.PE PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,055	1,105	6,017	8,417	9,625
Std.Fehler des MW	0,008	0,089	0,048	0,070	0,118
Varianz	0,000	0,048	0,014	0,030	0,084
Std.Abweichung	0,019	0,219	0,117	0,172	0,289
Variationskoeffizient	0,351	0,198	0,019	0,020	0,030
Median	0,048	1,053	6,000	8,450	9,650
geom. Mittelwert	0,052	1,090	6,016	8,415	9,621

Keine Ausreißer, alle Wertereihen sind normalverteilt.

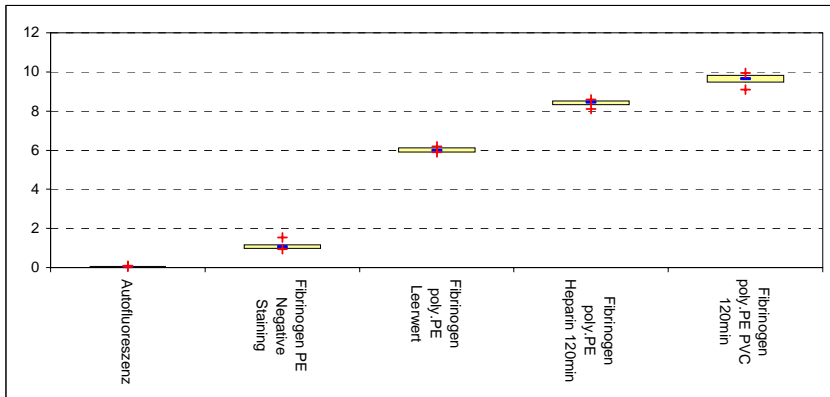
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p = 0,016$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	Fibrinogen NS	Fibrinogen poly Leerw.	Fibrinogen poly. Hep.120min	Fibrinogen poly.PVC 120min
Auto	0,0550	----	-1,0485*	-5,9617*	-8,3617*	-9,5700*
Fibrinogen NS	1,1050	Ja ($p < 0,001$)	----	-4,91312*	-7,313*	-8,5215*
Fibrinogen poly Leerw.	6,0167	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-2,400*	-3,6083*
Fibrinogen poly. Hep.120min	8,4167	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-1,2083*
Fibrinogen poly.PVC 120min	9,6250	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----



Grafik 3.100 : MW und SF der MeanFluorescence des polyklonalen Fibrinogen-Antikörpers bei Beobachtung der Granulozytenpopulation. Zunehmende Anheftung von PE-markiertem Fibrinogen an Granulozyten. (Leerwert < Heparinbeschichtung < PVC)



Grafik 3.101 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der MeanFluorescence des polyklonalen Fibrinogen-Antikörpers bei Beobachtung der Granulozytenpopulation. Zunehmende Anheftung von PE-markiertem Fibrinogen an Granulozyten. (Leerwert < Heparinbeschichtung < PVC).

3.2.5.5 Fibrin-Adhäsion an Thrombozyten

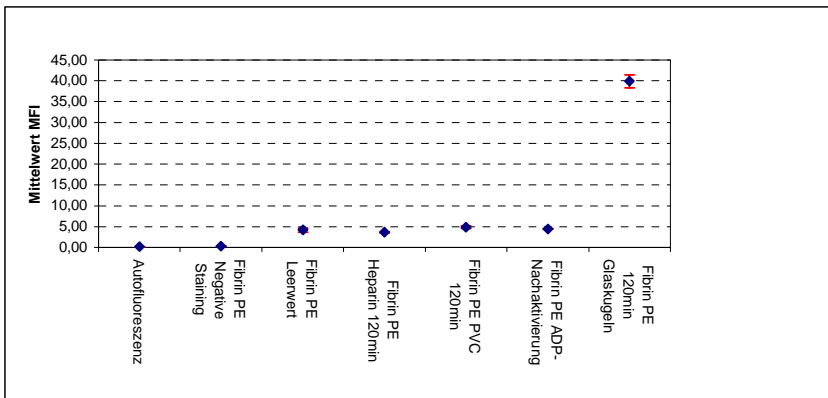
	Auto- fluores- zenz	Fibrin PE Negative Staining	Fibrin PE Leerwert	Fibrin PE Heparin 120min	Fibrin PE PVC 120min	Fibrin PE ADP-Nach- aktivierung	Fibrin PE 120min Glaskugeln
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,215	0,344	4,207	3,633	4,872	4,477	39,867
Std.Fehler des MW	0,052	0,011	0,494	0,141	0,351	0,041	1,579
Varianz	0,016	0,001	1,462	0,120	0,738	0,010	14,967
Std.Abweichung	0,128	0,027	1,209	0,346	0,859	0,100	3,869
Variationskoeffizient	0,598	0,077	0,287	0,095	0,176	0,022	0,097
Median	0,169	0,350	4,850	3,500	4,845	4,455	41,000
geom. Mittelwert	0,185	0,343	4,025	3,621	4,802	4,476	39,704

Keine Ausreißer, alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,290$, Leerwert gegen PVC 120min $p=0,297$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,008$, Leerwert gegen ADP-Nachaktivierung 120min $p=0,598$, Leerwert gegen Glaskugeln 120min $p<0,001$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede zwischen heparinbeschichtetem PVC 120min und PVC 120min, sowie zw. dem Leerwert und Glaskugeln 120min.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p=0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	Fibrin NS	Fibrin Leerw.	Fibrin Hep.120min	Fibrin PVC 120min	Fibrin ADP	Fibrin 120min Glas
Auto	0,215	----	-0,1295	-3,9920*	-3,41869*	-4,6570*	-4,2620*	-39,6520*
Fibrin NS	0,344	Nein (p=1,0)	----	-3,8624*	-3,2891*	-4,5274*	-4,1324*	-39,522*
Fibrin Leerw.	4,207	Ja (p=0,002)	Nein (p=1,0)	----	0,5733	-0,6650	-0,2700	-35,66*
Fibrin Hep.120min	3,633	Ja (p=0,013)	Ja (p=0,003)	Nein (p=1,0)	----	-1,2383	-0,84333	-36,233*
Fibrin PVC 120min	4,872	Ja (p<0,001)	Ja (p=0,019)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	0,3950	-34,995*
Fibrin ADP	4,477	Ja (p=0,001)	Ja (p=0,001)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	Nein (p=1,0)	----	-35,39*
Fibrin 120min Glas	39,867	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	Ja (p<0,001)	----



Grafik 3.102 : MW und SF der MeanFluorescence des Fibrin-Antikörpers in der Thrombozytenpopulation. Keine Anheftung von Fibrin an Thrombozyten in Leerwert, Heparinbeschichtung und PVC-Schlauch, jedoch starke Anheftung bei Zugabe von Glaskugeln in einen PVC-Schlauch.

3.2.5.6 CD 62P auf Thrombozyten

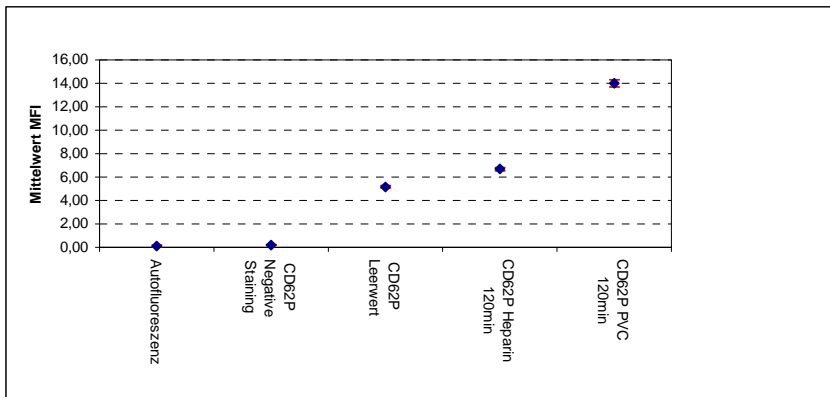
	Autofluoreszenz	CD62P Negative Staining	CD62P Leerwert	CD62P Heparin 120min	CD62P PVC 120min
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
Mittelwert	0,126	0,197	5,167	6,675	14,000
Std.Fehler des MW	0,075	0,022	0,099	0,131	0,289
Varianz	0,034	0,003	0,059	0,104	0,500
Std.Abweichung	0,184	0,053	0,242	0,322	0,707
Variationskoeffizient	1,467	0,268	0,047	0,048	0,051
Median	0,057	0,200	5,100	6,650	14,000
geom. Mittelwert	0,068	0,190	5,162	6,669	13,985

Keine Ausreißer, alle Wertereihen sind normalverteilt.

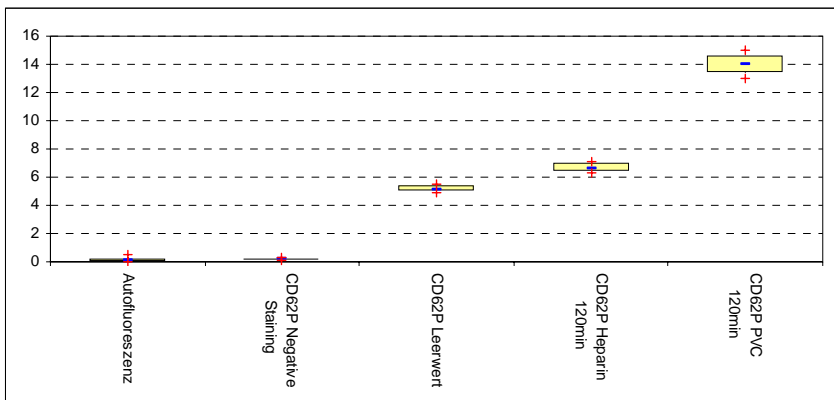
T-Test für unabhängige Stichproben: Leerwert gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Leerwert gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p = 0,016$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**

Kritische Mittelwert-Differenzen als ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zwischen Gruppenpaaren (rechts oben) und Signifikanzwertung mit Signifikanzgrenze $p = 0,05$ (links unten):

	(Mittelwert)	Auto	CD62P NS	CD62P Leerw.	CD62P Hep. 120min	CD62P PVC 120min
Auto	0,1256	----	-7,123e-02	-5,0412*	-6,549*	-13,8746*
CD62P NS	0,1967	Nein ($p = 1,0$)	----	-4,9700*	-6,4783*	-13,8033*
CD62P Leerw.	5,1667	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-1,5083*	-8,833*
CD62P Hep. 120min	6,6750	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----	-7,3250*
CD62P PVC 120min	14,0000	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	Ja ($p < 0,001$)	----



Grafik 3.103 : MW und SF der MeanFluorescence des CD62P-Antikörpers (PE) bei Beobachtung der Thrombozytenpopulation. Steigende Werte gegenüber Autofluoreszenz und NS. Schwach stärkere Markierung der Thr. im heparinbeschichteten Schlauch geg. Leerwert, starker Anstieg im PVC-Schlauch.



Grafik 3.104 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der MeanFluorescence des CD62P-Antikörpers (PE) bei Beobachtung der Thrombozytenpopulation. Steigende Werte gegenüber Autofluoreszenz und NS. Schwach stärkere Markierung der Thr. im heparinbeschichteten Schlauch geg. Leerwert, starker Anstieg im PVC-Schlauch.

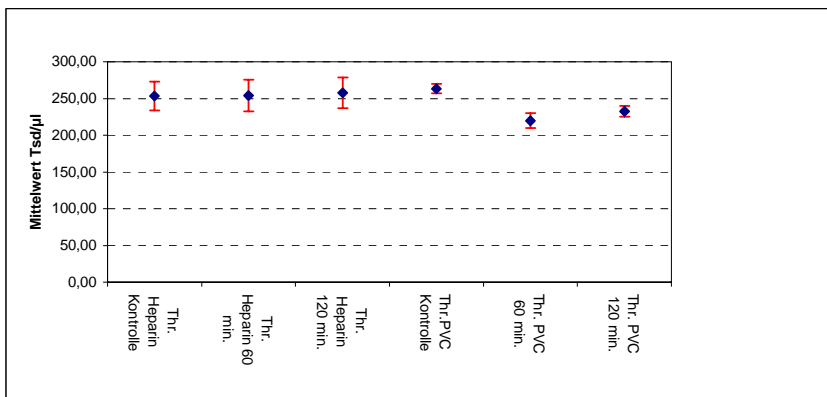
3.3.0 Zellzahlen

3.3.1 Thrombozytenzahl

Thr Tsd./ μ l	Thr. Heparin Kontrolle	Thr. Heparin 60 min.	Thr. Heparin 120 min.	Thr.PVC Kontrolle	Thr. PVC 60 min.	Thr. PVC 120 min.
gültige Fälle	7,000	7,000	7,000	13,000	13,000	13,000
Mittelwert	253,429	253,857	257,571	263,385	219,923	232,462
Std.Fehler des MW	19,645	21,340	20,721	6,387	9,884	7,378
Varianz	2701,619	3187,810	3005,619	530,256	1269,910	707,603
Std.Abweichung	51,977	56,461	54,824	23,027	35,636	26,601
Variationskoeffizient	0,205	0,222	0,213	0,087	0,162	0,114
Median	269,000	274,000	280,000	272,000	221,000	243,000
geom. Mittelwert	247,876	247,164	251,230	262,447	217,208	231,017

Keine Ausreißer, alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für nicht-abhängige Stichproben: Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 60min $p=0,9884$, Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,8870$, Kontrolle gegen PVC 60min $p=0,001$, Kontrolle gegen PVC 120min $p=0,0041$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p=0,114$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,1799$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und den 60min-Werten, sowie den PVC 120min-Werten.**



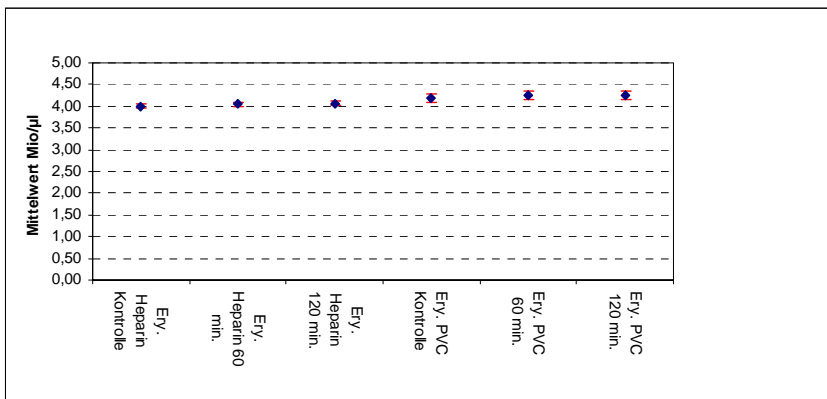
Grafik 3.105 : MW und SF der Thrombozytenzahl. Es findet gegenüber dem Leerwert ein Abfall der Thrombozyten in den Loops statt, der in den PVC-Schläuchen stärker ausgeprägt ist, als in den Schläuchen mit Heparinbeschichtung.

3.3.2 Erythrozytenzahl

Mio/µl	Ery. Heparin Kontrolle	Ery. Heparin 60 min.	Ery. Heparin 120 min.	Ery. PVC Kontrolle	Ery. PVC 60 min.	Ery. PVC 120 min.
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	12,000	12,000	12,000
Mittelwert	4,007	4,050	4,065	4,188	4,246	4,244
Std.Fehler des MW	0,055	0,046	0,053	0,087	0,094	0,101
Varianz	0,018	0,013	0,017	0,091	0,106	0,122
Std.Abweichung	0,135	0,113	0,131	0,302	0,326	0,349
Variationskoeffizient	0,034	0,028	0,032	0,072	0,077	0,082
Median	4,020	4,095	4,110	4,245	4,330	4,340
geom. Mittelwert	4,005	4,049	4,063	4,178	4,234	4,230

Keine Ausreißer, alle Wertereihen sind normalverteilt.

T-Test für nicht-abhängige Stichproben: Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 60min $p=0,5599$, Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,464$, Kontrolle gegen PVC 60min $p=0,6584$, Kontrolle gegen PVC 120min $p=0,6793$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p=0,1776$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,247$. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.



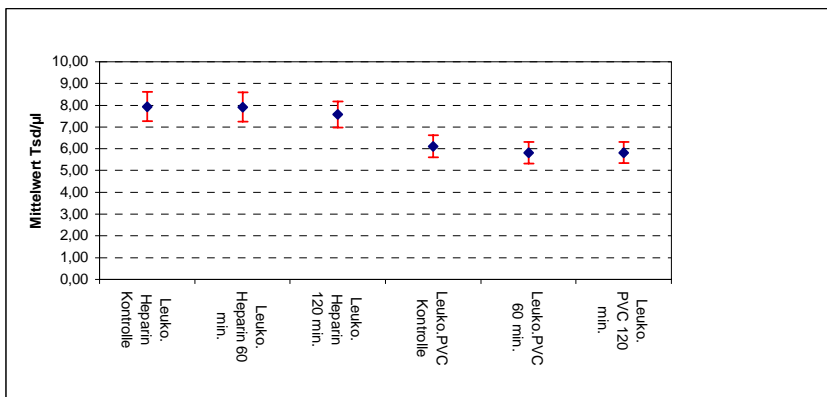
Grafik 3.106 : MW und SF der Erythrozytenzahl. Die Zahl der Erythrozyten bleibt gegen über dem Leerwert in den Loops weitgehend konstant.

3.3.3 Leukozytenzahl

Tsd/µl	Leuko. Heparin Kontrolle	Leuko. Heparin 60 min.	Leuko. Heparin 120 min.	Leuko.PVC Kontrolle	Leuko.PVC 60 min.	Leuko. PVC 120 min.
gültige Fälle	6,000	6,000	6,000	12,000	12,000	12,000
Mittelwert	7,933	7,917	7,583	6,117	5,817	5,825
Std.Fehler des MW	0,675	0,676	0,598	0,514	0,504	0,486
Varianz	2,731	2,742	2,146	3,176	3,054	2,835
Std.Abweichung	1,652	1,656	1,465	1,782	1,748	1,684
Variationskoeffizient	0,208	0,209	0,193	0,291	0,300	0,289
Median	9,000	8,750	8,400	5,600	5,200	5,300
geom. Mittelwert	7,774	7,757	7,454	5,887	5,589	5,612

Keine Ausreißer, alle Wertereihen normalverteilt.

T-Test für nicht-abhängige Stichproben: Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 60min $p=0,9864$, Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,7059$, Kontrolle gegen PVC 60min $p=0,6812$, Kontrolle gegen PVC 120min $p=0,6842$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p=0,0266$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,0451$. **Es finden sich signifikante Unterschiede zw. heparinbeschichtetem PVC 60min und PVC 60min, sowie zw. heparinbeschichtetem PVC 120min und PVC 120min.**



Grafik 3.107 : MW und SF der Leukozytenzahl. Die Zellzahlen bleiben weitgehend konstant gegenüber ihren Kontrollwerten.

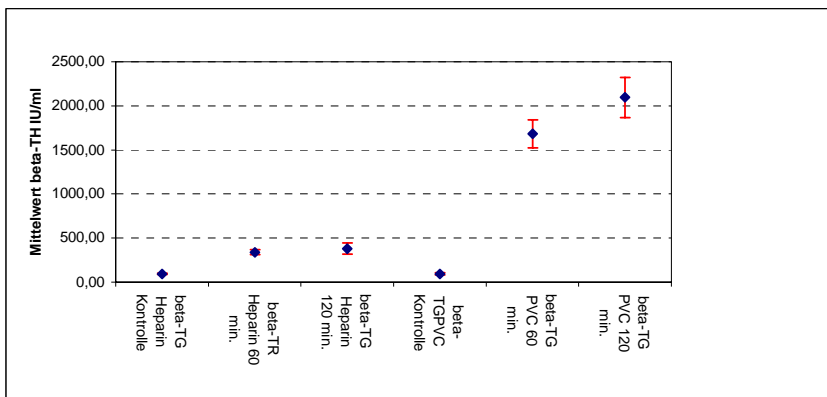
3.4.0 Humorale Marker

3.4.1 β -Thromboglobulin

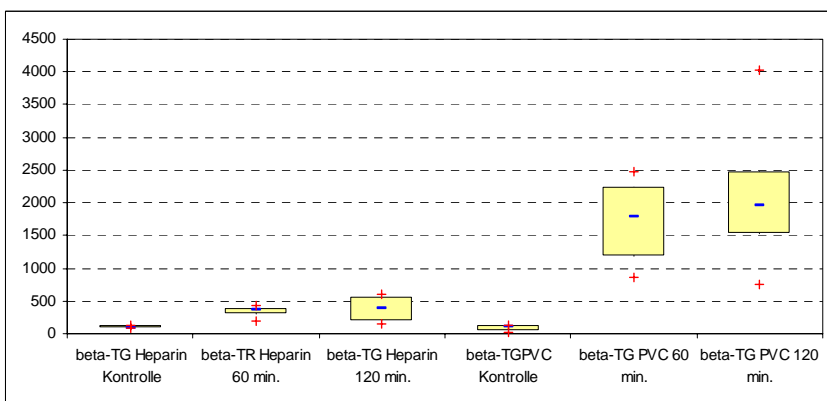
	beta-TG Heparin Kontrolle	beta-TR Heparin 60 min.	beta-TG Heparin 120 min.	beta-TGPVC Kontrolle	beta-TG PVC 60 min.	beta-TG PVC 120 min.
gültige Fälle	7,000	7,000	7,000	13,000	13,000	13,000
Mittelwert	93,897	339,881	379,243	93,710	1683,265	2093,758
Std.Fehler des MW	9,475	27,242	63,623	11,273	158,877	226,879
Varianz	628,412	5194,864	28335,563	1651,985	328145,973	669164,606
Std.Abweichung	25,068	72,075	168,332	40,645	572,840	818,025
Variationskoeffizient	0,267	0,212	0,444	0,434	0,340	0,391
Median	83,210	358,700	380,430	106,570	1780,200	1953,730
geom. Mittelwert	91,360	332,107	343,163	83,353	1585,767	1944,791

Keine Ausreißer, alle Wertereihen normalverteilt.

T-Test für nicht-abhängige Stichproben: Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 60min $p < 0,001$, Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Kontrolle gegen PVC 60min $p < 0,001$, Kontrolle gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p < 0,001$. **Es finden sich hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**



Grafik 3.108 : MW und SF der β -TG-Messung. Es kommt zu einem starken Anstieg des β -TG in beiden Loops gegenüber der Kontrolle. Dieser Anstieg ist im PVC-Schlauch stärker ausgeprägt, als in den heparinbeschichteten Schläuchen.



Grafik 3.109 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der β -TG-Messung. Es kommt zu einem starken Anstieg des β -TG in beiden Loops gegenüber der Kontrolle. Dieser Anstieg ist im PVC-Schlauch stärker ausgeprägt, als in den heparinbeschichteten Schläuchen.

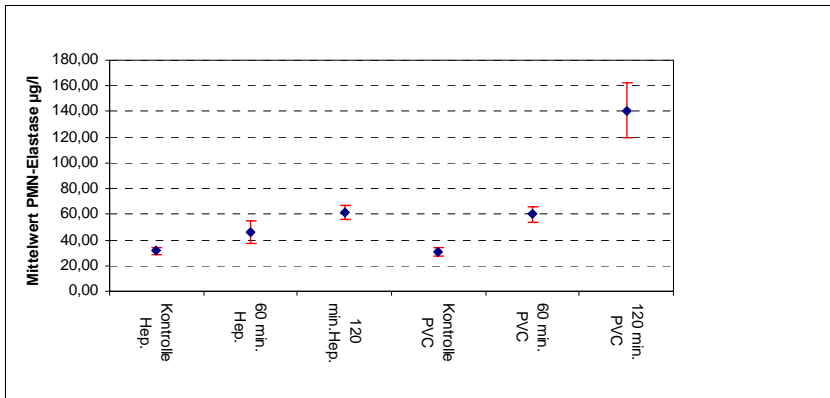
3.4.2 PNM-Elastase

$\mu\text{g/l}$	Kontrolle Hep.	60 min. Hep.	120 min. Hep.	Kontrolle PVC	60 min. PVC	120 min. PVC
gültige Fälle	7,000	7,000	7,000	13,000	13,000	13,000
Mittelwert	31,487	45,984	61,900	30,545	59,922	140,842
Std.Fehler des MW	2,451	8,980	5,405	3,160	5,935	21,124
Varianz	42,037	564,533	204,481	129,823	457,881	5800,755
Std.Abweichung	6,484	23,760	14,300	11,394	21,398	76,163
Variationskoeffizient	0,206	0,517	0,231	0,373	0,357	0,541

Median	28,150	38,890	60,600	28,660	56,610	130,800
geom. Mittelwert	30,968	42,081	60,551	28,694	56,720	127,421

Keine Ausreißer, alle Wertereihen normalverteilt.

T-Test für nicht-abhängige Stichproben: Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 60min $p=0,145$, Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p<0,001$, Kontrolle gegen PVC 60min $p<0,001$, Kontrolle gegen PVC 120min $p<0,001$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p=0,197$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,015$. **Es finden sich hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen außer heparinbeschichtetes PVC 60 – PVC 60, Kontrolle – heparinbeschichtetes PVC 60, sowie Signifikanz zw. beiden 120min Werten.**



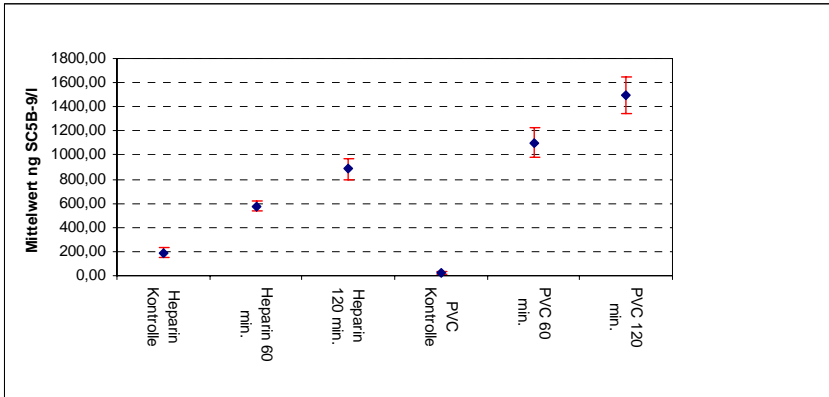
Grafik 3.110 : MW und SF der PNM-Messung. Es kommt zu einem Anstieg des PNM-Werts in beiden Loops gegenüber der Kontrolle. Dieser Anstieg ist im PVC-Schlauch stärker ausgeprägt, als in den heparinbeschichteten Schläuchen. Zum Zeitpunkt 60min zeigt der heparinbeschichtete Schlauch den geringsten Unterschied zum Leerwert/Kontrolle.

3.4.3 SC5b-9 – Komplement

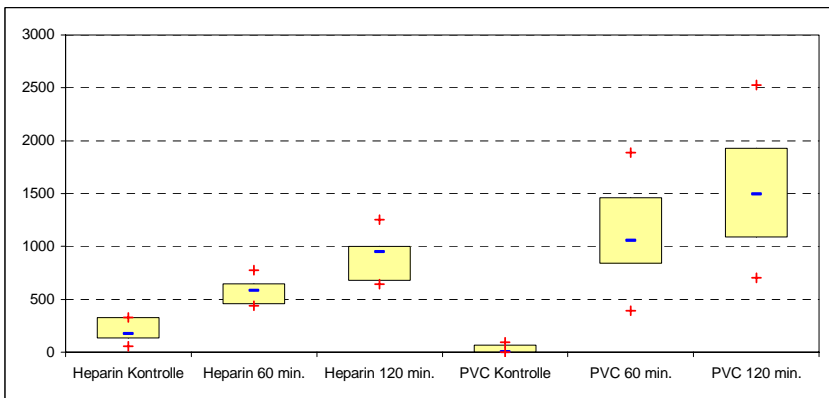
ng SC5B-9/l	Heparin Kontrolle	Heparin 60 min.	Heparin 120 min.	PVC Kontrolle	PVC 60 min.	PVC 120 min.
gültige Fälle	7,000	7,000	7,000	13,000	13,000	13,000
Mittelwert	190,241	578,417	882,944	26,185	1104,010	1495,509
Std.Fehler des MW	39,024	43,510	84,768	10,139	121,176	153,982
Varianz	10659,914	13251,678	50299,884	1336,476	190888,427	308237,525
Std.Abweichung	103,247	115,116	224,276	36,558	436,908	555,191
Variationskoeffizient	0,543	0,199	0,254	1,396	0,396	0,371
Median	176,340	582,690	949,190	2,960	1058,720	1494,680
geom. Mittelwert	164,724	568,806	859,067	----	1013,654	1400,233

Keine Ausreißer, alle Wertereihen normalverteilt.

T-Test für nicht-abhängige Stichproben: Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 60min $p < 0,001$, Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Kontrolle gegen PVC 60min $p < 0,001$, Kontrolle gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p = 0,006$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p = 0,0125$. **Es finden sich hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen.**



Grafik 3.111 : MW und SF der SC5b-9-Messung. Die Loops zeigen stark steigende Werte gegenüber den Kontrollen. Der Anstieg ist mit längerer Rotationsdauer stärker. Eine weitere Steigerung ist zwischen Heparin und PVC zu beobachten.



Grafik 3.112 : Box&Whisker-Grafik (Med. [-],Min./Max [+], 25./95.Perz. [Box]) der SC5b-9-Messung. Die Loops zeigen stark steigende Werte gegenüber den Kontrollen. Der Anstieg ist mit längerer Rotationsdauer stärker. Eine weitere Steigerung ist zwischen Heparin und PVC zu beobachten.

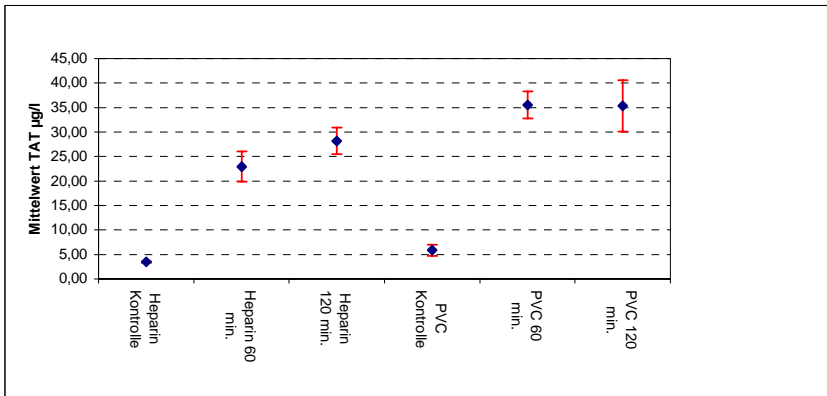
3.4.4 Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT)

	Heparin Kontrolle	Heparin 60 min.	Heparin 120 min.	PVC Kontrolle	PVC 60 min.	PVC 120 min.

gültige Fälle	7,000	7,000	7,000	13,000	13,000	13,000
Mittelwert	3,456	22,956	28,183	5,872	35,514	35,325
Std.Fehler des MW	0,141	3,049	2,706	1,137	2,741	5,253
Varianz	0,140	65,087	51,244	16,801	97,673	358,679
Std.Abweichung	0,374	8,068	7,158	4,099	9,883	18,939
Variationskoeffizient	0,108	0,351	0,254	0,698	0,278	0,536
Median	3,370	25,640	29,990	5,550	31,090	23,510
geom. Mittelwert	3,439	21,620	27,359	4,762	34,281	30,913

Ein Ausreißer (1 Wert in PVC Kontrolle:17,15), alle Wertereihen normalverteilt.

T-Test für nicht-abhängige Stichproben: Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 60min $p < 0,001$, Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p < 0,001$, Kontrolle gegen PVC 60min $p < 0,001$, Kontrolle gegen PVC 120min $p < 0,001$, heparinbeschichtetes PVC 60min gegen PVC 60min $p = 0,100$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p = 0,3538$. **Es finden sich hochsignifikante Unterschiede bei allen Vergleichen außer den direkten Vergleichen zwischen PVC und heparinbeschichtetem PVC (60/120min)**



Grafik 3.113 : MW und SF der TAT-Messung. Die Werte der Loops steigen gegenüber den Kontrollen an. Zu den Zeitpunkten 60min und 120min lassen sich weitere Anstiege zwischen Heparin- und PVC-Schlauch feststellen.

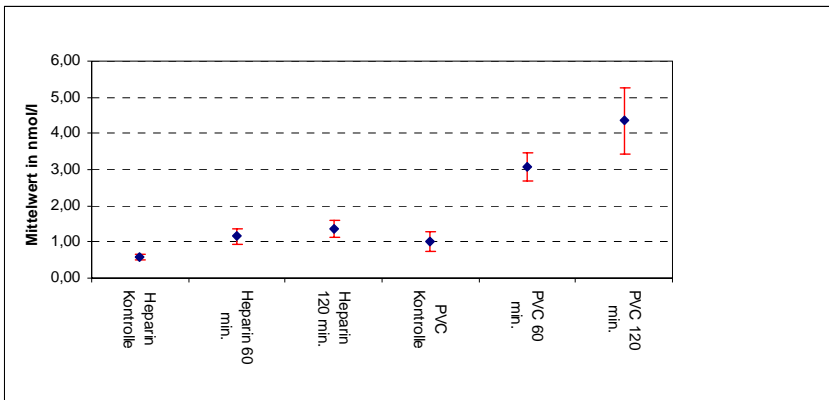
3.4.5 Prothrombinfragment F1+2

nmol/l	Heparin Kontrolle	Heparin 60 min.	Heparin 120 min.	PVC Kontrolle	PVC 60 min.	PVC 120 min.
gültige Fälle	7,000	7,000	7,000	13,000	13,000	13,000
Mittelwert	0,590	1,156	1,356	1,026	3,078	4,357
Std.Fehler des MW	0,069	0,209	0,245	0,269	0,408	0,921
Varianz	0,033	0,307	0,420	0,939	2,169	11,019
Std.Abweichung	0,182	0,554	0,648	0,969	1,473	3,320
Variationskoeffizient	0,309	0,479	0,478	0,944	0,478	0,762

Median	0,710	1,150	1,260	0,760	2,560	2,430
geom. Mittelwert	0,558	1,009	1,224	0,774	2,763	3,389

Keine Ausreißer, alle Wertereihen außer der PVC Kontrolle sind normalverteilt.

T-Test für nicht-abhängige Stichproben: Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 60min $p=0,025$, Kontrolle gegen heparinbeschichtetes PVC 120min $p=0,0109$, Kontrolle gegen PVC 60min $p<0,001$, Kontrolle gegen PVC 120min $p=0,002$, Heparin 60min gegen PVC 60min $p=0,004$, heparinbeschichtetes PVC 120min gegen PVC 120min $p=0,0310$. **Es bestehen hochsignifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und den 60min/120min-PVC-Werten, sowie zwischen heparinbeschichtetem PVC 60min und PVC 60min-Werten. Alle weiteren Vergleiche sind signifikant.**



Grafik 3.114 : MW und SF der F1+2-Messung. Während sich die Werte des Heparin-Schlauchs bei 60min und 120min Rotation weitgehend konform zur Kontrolle zeigen, steigen die Werte bei Verwendung einer PVC-Schlauchs stark an, vgl. Box&Whisker.

4.0.0 Diskussion

4.1.0 Extrakorporale Zirkulation und Biokompatibilität

Die Evaluation der Biokompatibilität von Fremdoberflächen unter Einsatz eines Simulationsmodells unterscheidet sich grundlegend von Untersuchungen in-vivo. Unter realen EKZ-Bedingungen ist das künstliche Perfusionssystem nur eine von vielen auf den Organismus des Patienten einwirkenden Variablen. Gleichzeitig laufen verschiedene Prozeduren ab, die ihrerseits Einfluß auf das Organ Blut haben. An erster Stelle stehen hier Narkose, chirurgische Maßnahmen, Transfusionen oder die Retransfusion aufbereiteten Saugerbluts. Weiterhin kommen Faktoren wie Hypothermie durch Einsatz kardioplegischer Lösungen, eine Hämodilution, Antikoagulation, Fremdmaterialeinbringung in den Patienten und eine grundlegend veränderte Hämodynamik hinzu. Die durch das Schlauchsystem auf das Blut einwirkenden Scherkräfte, sowie mechanische Schäden der Zellen während der EKZ sind ebenfalls bedeutend.

Von direkter Auswirkung auf die Gerinnung sind die eingesetzten Gerinnungshemmer wie die systemische Heparinabgabe. Dem Simulationsmodell fehlen hierbei folgende biologischen Systeme gegenüber dem Organismus

- Synthese von koagulations- und fibrinolyseaktiven Plasmaproteinen der Leber und Thrombozyten im Knochenmark
- kontinuierliche Umwandlung und Abbau dieser Proteine, hauptsächlich in der peripheren Zirkulation
- Clearance von Koagulations- und Fibrinolyseprodukten durch das retikuloendotheliale System (RES)
- Bereitstellung physiologischer Koagulations- und Fibrinolyseinhibitoren außer durch die Zellen im Loop
- Rekrutierung jüngerer Zellen aus dem Knochenmark nach Aktivierung
- Abbau von aktivierten Zellen im RES etc.

Besonders die letzten beiden Punkte lassen Studien zum klinischen Verhalten der bestimmten Marker notwendig werden.

Fremdoberflächen müssen generell als thrombogen eingestuft werden und die Auslösung des Gerinnungsprozesses durch Fremdoberflächen ist bestens bekannt und wird angewendet (Gerinnung nach Glaskontakt, Gerinnungsauslösung durch

Glasperlen in Blutabnahmesystemen). Die Kontaktphasenaktivierung stellt hierbei den Beginn der Aktivierungskaskade mit Stimulation weitreichender Signalwege sowohl im immunologischen als auch im plasmatischen Sinne dar und ist gleichzeitig der Ansatzpunkt im Bestreben hämokompatible Oberflächen zu schaffen. Das Verständnis der Fernwirkung kleinster Aktivierungen an verschiedenen Stellen der EKZ mit Summation von synergistischen Prozessen und der Folgen erscheint wichtig.

Es wurde in klinischen Studien versucht die bei jeder EKZ zum Standard gehörenden systemische Heparin-gabe bei Präsenz eines heparinbeschichteten Perfusionssystems zu vermindern (40;49) . Das Bestreben einer Reduktion des systemisch verabreichten Heparins erklärt sich aus den Komplikationen der Gabe, wie verlängerte Blutungszeit, dem Reboundeffekt des Heparins, Protaminkomplikationen, Thrombozytopenie (HIT I und II) und Osteoporosegefahr. Eine systemische Heparin-gabe ist derzeit jedoch nicht zu ersetzen, da die Thrombogenese auf dem Grundpfeilern Änderung der Blutzusammensetzung, Flussverlangsamung und Endothel-/Kontaktflächenänderung entsteht, und infolge der EKZ sich diese Verhältnisse auch innerhalb des Körpers ändern mit der Folge einer Thrombinpräsenz. Durch systemische Gabe und kovalente Bindung von Heparin auf der Fremdoberfläche lassen sich synergistische Effekte erzielen, die der Gerinnungsaktivierung entgegenwirken können. Aus den angeführten Gründen für eine Reduktion von systemischem Heparin wird versucht eine ideale „Titration“ beider Komponenten zu finden (27) .

Viele der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bestimmungen erlaubten die Vermutung einer verbesserten Hämokompatibilität von heparinbeschichteten Oberflächen gegenüber unbeschichtetem Material (medical grade-PVC). Es wurde früher angenommen, dass immobilisiertes Heparin (kovalent gebundene Beschichtung) in erster Linie während der EKZ zirkulierendes Thrombin inaktivieren und damit die festgestellten positiven Ergebnisse erzielen würde. Dieser Effekt des Heparin auf Thrombin bleibt unbestritten, jedoch richtet sich die Material- und Beschichtungsforschung heute auf die Untersuchung der positiven Effekte von Heparinbeschichtungen hinsichtlich einer verminderten Komplementaktivierung und geringeren Proteinabsorption.

Durch die Vielzahl der durchgeführten Bestimmungen ließen sich die **Vorgänge nach Kontaktphasenaktivierung** gut darstellen. Ein gutes Beispiel ist das Zusammenwirken von Thrombozytenadhäsion an Leukozyten mit zunehmender Expression der β -Integrine und Freisetzung von Substanzen aus Leukozyten (Elastase) und die Induktion von enzymatischen Vorgängen innerhalb der Zellen (Kallikrein-, Peroxidanstiege, Induktion des oxidativen Bursts). Gleiches gibt für Teile der Kaskaden im plasmatischen Gerinnungssystem durch die gemessenen Werte Thrombozytenadhäsion, Bindung von Fibrin und Fibrinogen, Ansteigen des Thrombin-Antithrombin-Komplexes und Liberation von Prothrombinfragment F1+2, sowie β -Thromboglobulin. Hier konnte beobachtet werden, dass die Werte sich entsprechend den vermuteten Gerinnungsabläufen entwickelten.

Gleiches wurde für Teile des aktivierten Komplementsystems über SC5b-9 (terminaler Komplementkomplex) zum vermehrten Auftreten freier Radikale in Form von Peroxiden in Leukozyten nachgewiesen. Die gefundenen Messwerte lassen das Blut im rotierenden Schlauch, übertragen auf die extrakorporale Zirkulation, wieder ein Stück weniger als „black box“ erscheinen und tragen zum Verständnis der Gerinnungsabläufe bei.

Die Versuche der hier vorliegenden Arbeit konzentrierten sich auf die Grundpfeiler der Oberflächenaktivierung: Thrombozyten, Leukozyten, Entzündungssystem und Immunsystem.

Die **Thrombozyten** reagierten auf die extrakorporale Zirkulation mit grundlegenden Veränderungen. Dies betrifft die Morphologie der Plättchen, ihre Oberfläche und Änderungen ihrer Stoffwechselforgänge, worauf die veränderte CD-41-Markierbarkeit hinweist. Gleichzeitig findet jedoch eine Expression anderer Rezeptoren statt, wie die Beobachtung der CD62P-Steigerung zeigt. Die Heparinbeschichtung vermochte beide Vorgänge günstig zu beeinflussen. Dies traf auch auf die Adhäsion von löslichen Gerinnungsbestandteilen zu. Es kam zu einer verminderten Adhäsion von Fibrinogen und Fibrin an Thrombozyten bei Präsenz der Beschichtung. Von weiterführendem Interesse wäre hier das Ausmaß der Fibrin- und Fibrinogenanheftung an die Fremdoberfläche, da diese einen ständigen Aktivierungsreiz auf die zirkulierenden Zellen ausübt, sowie eine quantitative Analyse der adhären Zellen (24;51) .

Es konnte ebenfalls eine positive Auswirkung der Beschichtung auf die Liberation von β -Thromboglobulin aus den Granula der Thrombozyten erfasst werden.

Die Vorgänge in und auf den Plättchen korrelieren mit dem allgemeinen Aktivierungsgrad der Gerinnung und wurden durch die beobachteten plasmatischen Marker unterstützt. So kam es zu einem Anstieg der Prothrombinfragmente F1+2, des terminalen Komplementkomplexes SC5b-9 und zu vermehrtem Auftreten von Thrombin-Antithrombinkomplexen (TAT). Wieder konnte die Heparinbeschichtung eine hämokompatiblere Umgebung herstellen. Im Gesamtzusammenhang der einzelnen Parameter wurde die Thrombogenität der Fremdoberfläche offenbar herabgesetzt.

Die Einzelzellbeobachtungen der Durchflußzytometrie auf Adhäsionen ließen sich sinnvoll mit den plasmatischen Markern ergänzen, wobei die plasmatischen Marker ein subjektiv eindeutigeres Verhalten und eine geringere Streuung der Messwerte zeigten. Dies könnte auf die längere Laborroutine mit den Bestimmungsansätzen im Sinne einer kontinuierlichen Bearbeitung zurückzuführen sein, wobei der kleine Nachteil durch eine maschinelle Markierung der Thrombozyten für die Durchflußzytometrie unter Umständen korrigiert werden könnte. Es steht derzeit allerdings keine derart einfache Methode, wie die Durchflußzytometrie, zur Verfügung um Adhäsionsstudien an Zellen in großer Zahl durchzuführen. Alternativ wäre die Elektronenmikroskopie einsetzbar, die nur einen Teilausschnitt zeigen kann. Nebenbei sei die in Russland beobachtete Erfahrung erwähnt, dass das Recycling von bereits verwendeten Perfusionsystemen offenbar ein vermindertes Aktivierungspotential in nachfolgenden Einsätzen zeigt. Es kommt offenbar zur Ablagerung von Blutbestandteilen mit der Folge einer hämokompatibleren Schicht auf der Fremdoberfläche, die einer Neointima gleichen könnte. Dies entspricht sehr entfernt dem Ziel des Tissue-Engineering.

Zu den auf die Aktivierung reagierenden Komponenten des Immunsystems gehörten insbesondere **Leukozyten** mit ihren Subpopulationen. Die Leukozyten zeigten ihren Aktivierungsstatus durch Änderung der Oberflächenrezeptoren und intrazelluläre Stoffwechselveränderungen an.

Die Oberflächenantigene CD11B und CD11C erfuhren eine Aufwärts-Regulierung im signifikanten Bereich. Dies traf nicht für die Oberflächenmarker CD18 und CD62L zu. Hier wurde ein uneinheitliches und nicht erwartetes Reaktionsmuster erfasst. CD18 wurde entgegen anderen Beobachtungen leicht aufreguliert und für CD62L kam es zu keinen deutlichen Unterschieden die ein Signifikanzniveau erreicht hätten. Der

Trend der Abwärts-Regulation war für CD62L jedoch erkennbar. Für die β -Integrine CD11B und CD11C konnte ein Vorteil durch Beschichtung erkannt werden. Von den drei Leukozytenpopulationen reagierten die Granulozyten am zuverlässigsten. Die Gründe für die nicht dem Literaturstand entsprechende Reaktion des CD18 wären Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Deutliche Unterschiede konnten bei den **flowenzymologischen Methoden** beobachtet werden. Die Stoffwechselfvorgänge stiegen teilweise stark an und konnten durch die Umsetzung von fluoreszenzmarkierten Substraten durch Enzyme detektiert werden. Sowohl der oxidative Burst und die eng mit ihm verzahnte Peroxidproduktion, als auch die Präsenz von Kallikrein und die Elastaseaktivität stiegen in Abwesenheit der Heparinbeschichtung stärker an als mit Beschichtungsvorteil der Schläuche. Die Steigerung der Elastaseumsätze mit fluoreszenzmarkierten Substraten korreliert hierbei mit der gemessenen PMN-Elastasebestimmung im Plasma. Beide Methoden kontrollieren und ergänzen sich gegenseitig. Signifikante Unterschiede bestanden bei fast allen Vergleichen der Schlauchtypen.

Fraglich bleibt der Einsatz einer Nachaktivierung mit fMLP und PMA zur Steigerung und Verbesserung der Trennschärfe der Analysen. Dieses Verfahren wurde beim oxidativen Burst und bei Kallikrein eingesetzt mit dem Ergebnis teilweise schwächerer Fluoreszenzsignale als ohne Verwendung von Nachaktivatoren, allerdings bei gleichem Trend der Werte. Für in-vitro-Versuche ohne Simulationsmodell sind Aktivierungsmaßnahmen durch fMLP und PMA notwendig um Reize auf Zellen einwirken zu lassen. Im Fall des angewendeten Chandler-Loop-Simulationsmodelles erscheint dies jedoch überflüssig oder sogar kontraproduktiv hinsichtlich der Ergebnisvergleiche. Die verwendeten CellProbe-Substrate scheinen von sich aus eine ausreichende Sensitivität und Spezifität zu besitzen.

Die Funktionen der **Zytokine** sind nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch zu vermuten, dass ihre Wirkungen ein breites Spektrum von Regulationssystemen beeinflusst. IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α stellen wichtige Regulatoren der lokalen und systemischen Entzündungsreaktion dar. Die untersuchten Zytokine Interleukin-1 β , Interleukin-2 zeigten gering ausgeprägte Reaktionen auf die Fremdoberfläche. Hier reagierten Granulozyten etwas eindeutiger als Lymphozyten und Monozyten. Für den Tumor-Nekrosefaktor konnte ein Vorteil der Heparinbeschichtung gezeigt werden.

Für IL-1 β und IL-2 konnte bei heparinbeschichtetem Material ein Trend zur verbesserten Biokompatibilität festgestellt werden. Zytokine können sowohl im ELISA, als auch durch direkte Markierung nach Behandlung der Leukozyten mit Permeabilisatoren und monoklonalen Antikörpern bestimmt werden. Für die Hämkompatibilitätsforschung werden in Zukunft weitere Tests zur Verfügung stehen, die die gefundenen Reaktionen der Zellen deutlicher erscheinen lassen. Es sollte nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Flowzytometrie mit direkt markierten Substraten eine relativ junge Analysemethode mit einer Reihe von Vor- und Nachteilen ist. Direkte Bestimmungsmöglichkeiten für ein Merkmal sind immer als Fortschritt anzusehen. Die intrazelluläre Detektion von Strukturen in lebenden Zellen wird in nächster Zeit einen größeren Stellenwert einnehmen und sicher neue Erkenntnisse auch in weiteren Untersuchungen der Hämo- und Biokompatibilität liefern. Neuere Ansätze, wie die Bestimmung des **HeatShock-Proteins (HSP 70)**, haben aufgrund der bisher schlechten Datenlage und teilweise unvollständigem Funktionsverständnis des Proteins, experimentellen Charakter. Dieser Zustand ändert sich mit weiterer Erforschung des Verhaltens und der Beobachtung des Proteins in klinischer Umgebung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollten durch weitere Studien überprüft werden. Auch hier ist die Anwendung eines vorkonfektionierten Antikörpers mit Fluorochrombeladung möglicherweise sinnvoller als die Sekundärmarkierung. Weiterhin ist unklar, ob andere Tests auf HSP70-Präsenz mit sensitiveren Methoden bessere Aussagen ergeben, da die Synthese des Proteins in sehr kleinem Maßstab erfolgt (PCR-Nachweis). Nachaktivierungsmethoden und erweiterte Kinetikstudien würden das Bild vervollständigen. Für Stressproteine wird derzeit vermehrte Grundlagenforschung betrieben, die eine präzisere Einschätzung des Einsatzes und der Aussagen des Parameters erlauben werden.

Die Anwendung der Durchflußzytometrie für die Evaluation der Hämkompatibilität von in der Herzchirurgie relevanten Fremdoberflächen hat sich vom methodischen Verfahren her als zuverlässig erwiesen. Nach Erfahrungssammlung lassen sich Fragestellungen nach Adhäsion und der Ausbildung von Oberflächenepitopen relativ einfach beantworten. Auch Änderungen der Fragestellung bei hinzutretenden neuen Erkenntnissen ist leicht durchzuführen und die Methoden lassen sich ohne Schwierigkeiten optimieren.

Verbesserungsvorschläge für die durchflußzytometrischen Analysemethoden betreffen in erster Linie die Lyse und die teilweise vorgenommene Sekundärmarkierung der Antikörper, sowie die räumliche Anordnung des Labor- und Messplatzes. Für erstere Punkte werden zunehmend maschinelle Verfahren entwickelt, die durch „routiniertes“ Abarbeiten eine größere Konsistenz der Analyseergebnisse bezogen auf die technische Durchführung ermöglichen werden. Auch die kommerzielle Bereitstellung fertig mit Fluorochromen markierter Antikörper wird ständig ausgeweitet, sodass die Sekundärmarkierung (Fibrin, Fibrinogen, HSP-70) bald nicht mehr notwendig sein dürfte. Die Bereitstellung erweiterter „immunologischer Baukastensysteme“ (Sekundärmarkierungen für versch. Spezies, Kontrollreagenzien) der Analysereagenzien für die Durchflußzytometrie ist für die experimentelle Forschung weiterhin essentiell. Es wurde bereits im Diskussionsteil der Enzyme auf die Wichtigkeit der räumlichen Nähe von Probenbearbeitung und Messplatz hingewiesen. Dies gilt insbesondere bei Verfahren mit kleinen Zeitfenstern zwischen Inkubation des Ansatzes mit Substraten und Messung.

Einen oft unbemerkten Stolperstein stellen die Fluorochrome der bereits fertig konjugierten monoklonalen Antikörper dar. Hier sind die Exzitations- und Emissionswellenlängen so häufig unterschiedlich, dass es zu Verwechslungen kommen kann. Dies trifft insbesondere auf sog. Tandemfluorochrome zu, die die Exzitationsenergie untereinander weitergeben. Ein Verzicht auf patentierte, wohlklingende Namen für die Konjugationsmethode und dafür eine deutliche Markierung der Reagenzien mit spezifischen Daten auf dem Etikett wäre sicherlich von Vorteil. Eine Vielzahl der Fluorochrome erfordern den Austausch von Filtern im Durchflußzytometer, was bei Nichtkenntnis der genauen Wellenspektren übersehen werden kann und zu materiellem und zeitlichen Schäden führt. Für das Messen der Probe ist der kritischste Punkt das korrekte Setzen der Statistikregionen. Die Zuordnung von Populationen zu Gates wurde von der Gerätesoftware durch die Möglichkeit des Autogating in drei Sensitivitätsstufen wesentlich erleichtert. Eine Autogating-Funktion für die Histogramme wäre in zukünftigen Softwarereleases wünschenswert.

Die technische Ausstattung der Durchflußzytometer wird sich in den nächsten Jahren hoffentlich schneller an das zeitgemäße technische Niveau der Datenverarbeitung anpassen. Die Ausstattung der Geräte mit moderneren Massenspeichern (auswechselbar) und portierbaren Analyse-Anwendungen, die auf gängigen

Betriebssystemen lauffähig sind, wären als Grundvoraussetzung zu sehen und zu verbessern.

Die Literaturrecherche ergab, dass zur Beurteilung der Biokompatibilität on Fremdoberflächen eine **Vielzahl von Methoden** eingesetzt werden. Aus der hohen Zahl der Methoden folgen Schwierigkeiten beim Vergleich der Ergebnisse von Materialien zwischen verschiedenen Studiengruppen. Hier wäre die Einführung von Standardmethoden für eindeutige und aussagekräftige Parameter sinnvoll. Dagegen spricht jedoch der schnelle Fortschritt in der Entwicklung neuer Analysemethoden und Verfahren. Hier kann als Beispiel die relativ neue durchflußzytometrische Bestimmung von intrazellulären Antigenen, wie die Flowenzymologie oder die Zytokinbestimmungen, angeführt werden.

Auch liegen nur wenige Untersuchungen mit **Simulationsmodellen** vor. Hier könnte einerseits mit einer zu simplifizierten Simulationsmethode der EKZ im Gegensatz zu Studien unter realen EKZ-Bedingungen argumentiert werden, jedoch scheinen Simulationsmodelle, wie der ChandlerLoop, besser geeignet, isolierte Aussagen über das Verhalten von biokompatiblen Materialien während der Kontaktphase zu geben. Der „closed-loop“-Charakter des Simulationsmodells mit seinen Vor- und Nachteilen ist bei diesem Untersuchungsabschnitt durchaus erwünscht. Ein Anspruch auf klinische Gültigkeit der in-vitro gefundenen Ergebnisse wird hierbei nicht erhoben, sondern eine weitere kritische Prüfung der gefundenen Sachverhalte unter klinischen Bedingungen angeregt.

Zwischenresumee

Die optimale Umgebung für Blut bleibt das intakte Endothel. Es ist derzeit nicht möglich, die Hämokompatibilität des Endothels ausreichend mittels Fremdmaterialien oder Beschichtungen zu imitieren. Beim Blick in die Zukunft der Perfusionstechnik mit hämokompatiblen Materialien werden wahrscheinlich Kombinationen aus neuen Materialien und modernen Pharmaka die weitere Entwicklung bestimmen. Hier werden sowohl neue Beschichtungsmedien durch neue Heparine oder andere gerinnungshemmende Substanzen, als auch neue Kunststoffvarianten zum Einsatz kommen. Wird bedacht, welchen Einfluß alleine die von Larm entwickelte Endpunktbefestigung des Heparins an die Fremdoberfläche hatte, liegt in der Pharmakonapplikation auf der Oberfläche weiteres Potential. Letztendlich sind

intelligente Werkstoffe und pharmakologische Wirkstoffe zu fordern, die auf den momentanen Zustand des Patienten, etwa durch Freisetzung aktivierungshemmender Substanzen, reagieren. Die Möglichkeiten des Tissue-Engineering mit Herstellung eines nahezu vollständigen Endothelmimikris dürfte in den nächsten Jahren weiter ausgeschöpft werden und vollkommen neue Perspektiven eröffnen.

4.2.0 Durchflußzytometrische Marker

4.2.1 Oberflächenantigene CD11B, CD11C, CD18 und CD62L

CD11B

Der Anstieg des β -Integrin CD11B während der Rotation deckte sich mit der Vorstellung, dass dieses Epitop während der extrakorporalen Zirkulation eine Up-Regulation erfährt. Dies wurde auch in den Arbeiten von Hogevoit et al. (26), (in-vitro-Studie), Dreyer et al. (15) und Finn et al. (18) beschrieben, die Parameter wurden jedoch während einer realen EKZ am Patienten erhoben (30min nach Beginn des EKZ-Einsatzes bis 24h später). Bei Messungen unter echten EKZ-Bedingungen schien die Expression des Antigens CD 11B jedoch geringer zu sein. Eine Erklärung für höhere Werte im Simulationsmodell ist die fehlende Rekrutierung neutrophiler Zellen aus Leber und Knochenmark und somit eine fehlende Durchmischung des Blutpools mit bisher nicht mit der Oberfläche in Kontakt getretenen Neutrophilen. Eine Abwärts-Regulation des Epitops wurde von White-Owen et al. (90) nach schweren Traumen, sowie von Babcock et al (89) nach thermischen Verletzungen gefunden. Eine Aufwärts-Regulation ließ sich jedoch auch in-vitro ohne Simulationsmodell durch 30-min. Inkubation mit FMLP erzeugen (Mathew et al. (47)), wobei die MeanFluorescence des gemessenen CD11B-Antikörpers signifikant anstieg ($p < 0,05$). Der Vergleich zwischen unbeschichtetem PVC und heparinbeschichteten PVC zeigte den Vorteil der Beschichtung zu beiden Abnahmezeitpunkten an. Im Kontrast dazu wies Karlsson et al. (36) jedoch darauf hin, dass die Aktivierung von Granulozyten durch die Oberflächen von blutleitenden Geräten, wie Dialysatoren, für den Patienten wenig schädlich sein sollte - dies wegen des geringen Prozentsatzes der Zellen, die mit der künstlichen Oberfläche in direkten Kontakt traten

Die Aktivierung von Monozyten mit nachfolgender Aufregulierung des CD11B Epitops, wie von Rinder et al. (63) beschrieben, konnte mit dem Simulationsmodell nicht nachvollzogen werden, wobei die Beobachtung der Arbeitsgruppe unter in-vivo Bedingungen gemacht wurde. Interessant war der Versuchsansatz von Mathew (47), der unter Zugabe von Adesin bzw. Adenosin eine wesentlich schwächere Aufwärts-Regulation von CD11B beobachtete ($p < 0,01$, bzw. $p < 0,05$). Falls die Auswirkungen der aktivierten β -Integrine besser verstanden werden können, wäre eine Kombination des Einsatzes heparinbeschichteter Schlauchsysteme mit gleichzeitiger Applikation der angewandten Aktivierungshemmer von Vorteil für Patienten.

Die Auswertungen der Messwerte für CD11B ergaben in der Versuchsserie der vorliegenden Arbeit ansteigende Werte für die Proben, die im ChandlerLoop behandelt wurden. Der deutlichste Anstieg wurde bei Granulozyten zwischen den beiden Schlauchtypen beobachtet mit einem Anstieg der MeanFluorescence von 25,68 auf 45,26 ($p = 0,0,25$) zum Zeitpunkt 60min, sowie von 15,682 auf 39,88 ($p < 0,01$) für den 120min-Wert.

Die Lymphozyten- und Monozytenpopulationen reagierten nicht innerhalb der Signifikanzgrenzen auf die Aktivierung in den Loops. Der Vergleich der Unterschiede zwischen Negative Staining und der Autofluoreszenz gegen die Messergebnisse der antikörpermarkierten Proben ergaben die erwarteten Signifikanzen.

Mit welcher Wahrscheinlichkeit sich die Vermutung einer verminderten Aktivierung der Leukozyten durch den Einsatz heparinbeschichteter Systeme und damit auch einer verminderten Leukozyten-Endothel-Interaktion auf in-vivo-Bedingungen übertragen lässt, muss in klinischer Umgebung untersucht werden. Für weitere Studien ist der ChandlerLoop aufgrund der übereinstimmenden Messergebnisse mit den recherchierten Arbeiten als geeignet anzusehen. Als Aktivierungsmarker zur Evaluation der Hämokompatibilität von Fremdoberflächen ist CD11B sicherlich geeignet.

CD11C

Für das CD11C-Epitop wurde eine Aufwärts-Regulation während der Aktivierung im Simulationsmodell erwartet. Das Messergebnis gestaltete sich jedoch uneinheitlich.

Für die Lymphozytenpopulation konnten in den Vergleichen der Mittelwerte zwar Anstiege der MeanFluorescence zwischen den beiden getesteten Schachtypen zum Abnahmezeitpunkt 60min und 120min festgestellt werden (Heparin 60min 4,36 – PVC 60min 12,7 / Heparin 120min 4,08 – PVC 120min 12,1), die Mediane zeigten bei diesen Werten jedoch geringere Anstiege (Heparin 60min 5,8 – PVC 60min 6,1 / Heparin 120min 5,06 – PVC 120min 6,025). Signifikanz bestand auf diesem Niveau nicht.

Für die Monozytenpopulation wurde ein ähnliches Bild gezeichnet mit einem schwachen Anstieg der MeanFluorescence beim Vergleich beider Schlauchtypen zu den Zeitpunkten 60min und 120min. Signifikanzen wurden jedoch nicht erreicht.

Für die Granulozyten wurde ein Anstieg der MeanFluorescence im PVC-Schlauch zum Zeitpunkt 120min (19,37) gegen den heparinbeschichteten Schlauch zur gleichen Zeit (19,375) im Student´s-T-Test signifikant gewertet ($p=0,026$).

Das Gesamtbild beschrieb ein stärker werdendes Fluoreszenzsignal für CD11C sowohl mit zunehmender Rotationsdauer, als auch für das unbeschichtete Material, wobei die Vergleiche zwischen Autofluoreszenz, bzw. Negative Staining und den Antikörpersignalen wie erwartet eindeutig signifikant waren (Kontrollfunktion). Beim Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen fiel eine Korrelation dieser Werte auf. Hogevoid et al (26) beschrieben ebenfalls signifikante Anstiege der Epitope auf Granulozyten bei Verwendung eines PVC-Schlauchs im Vergleich zum heparinbeschichteten Schlauch ($p<0,02$ zum Abnahmezeitpunkt 120min), sowie verzögerte, schwächere Ausprägung des Merkmals auf Monozyten, dies in einem ähnlichen Versuchsaufbau wie in der vorliegenden Arbeit.

Die Beobachtung der ansteigenden Werte für CD11C und CD11B gegenüber „hämoinkompatiblerem“ Material wie PVC ließen den Schluss zu, dass ein gemeinsamer Regulations- und Expressionsmechanismus vorliegt, was in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen steht (Hogevoid et al. (25)).

Beim Vergleich mit in-vivo-Studien über CD11C während realen Bypass-Situationen kamen diese Arbeitsgruppen zu höheren Anstiegen des Epitops CD11C (Deist et al. (42)) auf Granulozyten ($p<0,0019$ bei Einsatz unbeschichteter Schlauchsysteme, wobei der Peak des Anstiegs bei 15min lag und ab 30min weitgehend konstant blieb. Da CD11B einen stärkeren Anstieg auswies als CD11C und beide β -Integrine offenbar dem gleichen oder einem ähnlichen Regulationsmechanismus unterliegen, stellte sich die Frage nach dem Grund des verzögerten CD11C-Anstiegs.

Lösungsansätze sind eine eventuell zu kurze Rotations-/Aktivierungsdauer der Zellen, sowie unterschiedliche Setups der Versuche bei Vergleichen zwischen in-vivo und in-vitro. Es sollte geprüft werden, ob eine schwächere Aktivierung während der Rotation eventuell durch Nachaktivierung mit FMLP oder PMA im Sinne eines linearen Boostereffekts verstärkt werden kann. Dies sollte in folgenden Untersuchungen getestet werden. Vor Nutzung von CD11C als Aktivierungsmarker für die Hämkompatibilität von Fremdoberflächen sollte das Reaktionsmuster und die Reaktionskinetik des Epitops weiter untersucht werden.

CD18

Für den Marker CD18 wurde bei den Messungen ein uneinheitliches Aktivierungsmuster festgestellt. Während CD18 in der Lymphozytenpopulation keine Änderung erfuhr, stiegen in der Monozytengruppe die Messwerte der MeanFluorescence beim Vergleich zwischen Heparinbeschichtung und nativem PVC zum Zeitpunkt 120min an (Heparin 45,97 MFI auf PVC 75,08 MFI), jedoch ohne signifikant zu werden ($p=0,32$). In der Granulozytengruppe war dieser Anstieg stärker ausgeprägt mit einer Zunahme der MeanFluorescence von Heparin 120min (20,1 MFI) auf PVC 120min (35,2 MFI). Dieser Anstieg konnte im Student's T-Test als signifikant gewertet werden ($p=0,011$), was jedoch von der Varianzanalyse nicht bestätigt wurde ($p=0,979$). Hierbei waren die Unterschiede der Autofluoreszenz- bzw. der Negative-Staining-Werte jedoch in allen Populationen und gegenüber allen Antikörper-Messungen signifikant, was als positive Kontrolle des Versuchsaufbaus gewertet werden konnte.

Insgesamt ist der Anstieg des Parameters nicht einfach mit den Erwartungswerten und den Ergebnissen anderer Studiengruppen zu vereinbaren. Peters et al. fanden bei einer Untersuchung der Thrombozytenaktivierung in Blut eine Erhöhung der CD18-Expression im Zusammenhang mit der Aktivierung von Blutplättchen durch ADP/Thrombin (59), wobei es sich in erster Linie in Ausbildung der Epitope auf Neutrophilen handelte, die Komplexe mit aktivierten Thrombozyten geformt hatten. Dieser Vorgang konnte im vorliegenden Simulationsmodell ebenfalls angenommen werden. Unter realen EKZ-Bedingungen wurden Abnahmen der CD18-Werte beobachtet, als deren Ursache die Rekrutierung junger Granulozyten aus dem Knochenmarkt, auf einen ausgelösten inflammatorischen Reiz hin, vermutet wurde.

Diese jüngere Granulozytengeneration war offenbar noch nicht im gleichen Maß zu Expression des CD18-Merkmal befähigt (Julila et al. (30)). Die Expression von CD18, einem Bestandteil der Gruppe der Adhäsionsmoleküle, vermittelt die Anheftung von Leukozyten an das Endothel der Gefäße. Es stellt sich die Frage, ob in-vivo ermittelte abnehmende Werte des Markers auch auf einen Verlust der Epitope durch die Bindung an die Gefäßwand zurückzuführen sind, und die in dieser Arbeit leicht ansteigenden Werte in diesem Zusammenhang durch die Abwesenheit einer physiologischen Gefäßwand mit vermindertem Verlust an Epitopen erklärt werden können.

Dennoch zeigte Redmond et al. (62) eine Abnahme der CD18-Werte bei Verwendung heparinbeschichteter Schlauchsysteme (Carmeda CBAS) gegenüber Standard-PVC-Systemen in einer EKZ-Studie mit Schweinen auf (CD18 zum Zeitpunkt 60min nach EKZ-Einsatz 29,4% bei PVC gegen 26% bei Heparinbeschichtung). Dies wurde durch Tarnok et al. (72) unterstützt, der eine Abnahme der CD18-MeanFluorescence während der extrakorporalen Zirkulation bei Kindern beobachtete ($p < 0,03$ gegenüber dem Ausgangswert).

Der Regulationsmechanismus der CD18-Familie der Adhäsionsmoleküle ist bisher nicht ausreichend bekannt, um eindeutige Schlüsse aus den Messwerten auf die Einflüsse des Epitops auf den Organismus zu treffen, bzw. die Hämokompatibilität der untersuchten Fremdoberflächen damit zu evaluieren.

CD62L

Für den Marker CD62L (L-Selectin) wurden bei den Messungen äußerst heterogene Werte gefunden. Während die Vergleiche zwischen den Kontrollen (Autofluoreszenz und Negative Staining) bei Lymphozyten erwartet signifikant waren, zeigten sich keine Unterschiede beim Vergleich der Schlauchtypen und der Abnahmezeitpunkte untereinander. Dies traf auch für die Monozyten- und Granulozytenpopulationen zu. Für die Monozyten wurden Anstiege der MeanFluorescence zu Lasten des nativen PVC-Materials bei den Abnahmezeitpunkten 60min und 120min beobachtet, ohne dass diese signifikante Werte erreichten.

Erwartete Werte zeigten sich, jedoch ohne signifikante Relevanz, in der Granulozytenpopulation. Hier kam es zu einem Abfall der MeanFluorescence des CD62L-Antikörpers zum Abnahmezeitpunkt 60min (Heparin 16,7 MFI, PVC12,24MFI)

und 120min (Heparin 14,34MFI , PVC 9,02). Die Mediane zeigten eine sehr ähnliche Konstellation. Dieses Verhalten wurde als Down-Regulierung des Epitops durch die Aktivierung gewertet. Die Annahme beruhte jedoch auf Sichtung der Messwerte und ist dementsprechend subjektiv.

Die Box-Whiskey-Darstellungen der Werteverteilungen demonstrieren die starken Schwankungen der Messwerte trotz stabilen Versuchsbedingungen und gleichförmiger Analysedurchführung. Es ist hervorzuheben, dass sich die Autofluoreszenz- und die Negative-Staining-Messwerte allesamt unter denen des CD62L-Antikörpers befanden, was als positive Kontrolle für den korrekten Analysevorgang gewertet werden konnte.

Die Literatursuche spiegelte ebenfalls unterschiedliche Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen mit der Reaktion von CD62L auf Fremdoberflächen, aber auch auf die reale EKZ, wieder. Høgevoid et al. (26) kam dem Versuchsaufbau hier am nächsten durch Einsatz eines Simulationsmodells mit heparinbeschichteten Membranoxygenatoren und heparinbeschichteten Verbindungsschläuchen im Vergleich mit unbeschichtetem Material. Die Untersuchung des CD62L-Antigens ergaben ein verzögertes Absinken der MeanFluorescence nach 2 Stunden Aktivierung auf Monozyten und Granulozyten, ohne statistisch signifikant zu sein. Auch andere Reize auf die Zellen, wie die Hämofiltration, bei der ebenfalls heparinbeschichtete Schlauchsysteme gegen unbeschichtetes Material getestet wurde, zeigten schwache bis keine Aktivierung von CD62L auf Granulozyten (Toft et al. (78)). Dennoch wurden Anstiege von CD62L auf Monozyten während EKZ beschrieben (Ljunghusen et al. (44)). Es lagen aber auch Berichte über keine Änderung der Expression des Merkmals während realer EKZ vor (Macey et al (45)).

Um klare Aussagen über die Funktionsfähigkeit des Epitops und dessen Aktivierungsfähigkeit machen zu können, sollten Positivkontrollen eingesetzt werden. Mögliche Ansätze sind in die Loops mit dem Blut eingegebene Glasperlen (wie in anderen Versuchen dieser Arbeit geschehen) oder eine Maximalaktivierung mittels PMA oder FMLP. Die Messung der maximal möglichen Reaktion der Zellen auf diese Reize würde die Messungen in Relation zeigen. Für die Testung der Biokompatibilität von Fremdoberflächen ist nach derzeitigem Stand das CD62L-Antigen nur bedingt einsetzbar.

4.2.2 Intrazelluläre Enzymbestimmungen

4.2.2.1 Oxidativer Burst

Oxidativer Burst (nativ)

Die Messwerte für den oxidativen Burst zeigten eine erhöhte MeanFluorescence der Proben aus den Schläuchen gegenüber dem Leerwert an. Wie auch alle Vergleiche der Autofluoreszenz mit dem Proben aus den Schläuchen waren diese Unterschiede in der ANOVA hochsignifikant. Beim Vergleich der MeanFluorescence des heparinbeschichteten Schlauchs mit dem unbeschichteten Schlauch konnte für die Monozytenpopulation kein Unterschied, für die Lymphozyten ein geringer Anstieg der MeanFluorescence (Heparin 6,169MFI gegen PVC6,491MFI, keine Signifikanz), aber für die Granulozytenpopulation ein in der ANOVA als signifikant zu wertender Anstieg (Heparin 142,34MFI gegen PVC 170,5MFI, $p=0,023$) verzeichnet werden.

Die Aktivierung während 120min. Rotation im Chandler-Loop betraf somit in erster Linie die Granulozyten und wurde durch die Heparinbeschichtung vermindert. Lymphozyten und Monozyten reagierten zwar auch schwach auf den Aktivierungsreiz, jedoch ließen sich keine Vorteile der Heparinbeschichtung für diese Populationen feststellen.

Oxidativer Burst mit PMA-Nachaktivierung

Die Nachaktivierung mit PMA nach 120min Rotation der beiden Schlauchtypen zeigte eine hochsignifikante Zunahme der MeanFluorescence zwischen dem Leerwert und dem heparinbeschichteten Schlauch (Leerwert 5,12MFI gegen Heparin 12,11MFI , $p<0,01$), zwischen dem Leerwert und dem PVC-Schlauch (Leerwert 5,12MFI gegen PVC 16,123, $p<0,01$), sowie zwischen dem heparinbeschichteten und dem unbeschichteten Schlauch (Heparin 12,11 gegen PVC 16,12, $p<0,01$) in der Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur.

Für die Monozyten wurden außer zwischen der Autofluoreszenz und dem Leerwert, dem heparinbeschichteten Schlauch, sowie dem PVC-Schlauch keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Es kam zu einem geringen Abfall der Aktivität des oxidativen Bursts.

In der Granulozytenpopulation wurden starke und signifikante Unterschiede zwischen dem Leerwert und dem PVC-Schlauch, sowie zwischen beiden Schlauchtypen

beobachtet. Keine Signifikanz bestand zwischen dem Leerwert und dem heparinbeschichteten Schlauch. Dies konnte unter dem Aspekt der Biokompatibilität positiv bewertet werden.

Es zeigte sich insgesamt eine stärkere Reaktion auf den Aktivierungsreiz als bei der Messung des oxidativen Bursts ohne PMA-Nachaktivierung. Der Anstieg wurde auf die Nachaktivierung zurückgeführt. Ein Vorteil der Heparinbeschichtung mit geringerer Reaktion des oxidativen Bursts war nachvollziehbar.

Oxidativer Burst mit FLMP-Nachaktivierung

Im Lymphozytengate konnten Anstiege der MeanFluorescence für beide Schlauchtypen gegenüber dem Leerwert beobachtet werden. Eine Signifikanz wurde allerdings nur zwischen dem Leerwert und dem PVC-Schlauch erreicht (Leerwert 2,97MFI gegen PVC 7,83MFI, $p < 0,01$). Der geringe Anstieg der MeanFluorescence zwischen Leerwert und dem heparinbeschichteten Schlauch von 2,97MFI auf 3,49MFI konnte als Zeichen einer positiven Biokompatibilität gewertet werden.

Für die Monozyten ergaben sich keine ansteigenden Werte, wobei die Vergleiche zwischen Autofluoreszenz und Leerwert, bzw. Schlauchtypen als Kontrolle hochsignifikant waren.

Die Granulozytenpopulation reagierte stark auf die Voraktivierung während der Rotation und Nachaktivierung mit FMLP. Alle Vergleiche wiesen in der Varianzanalyse hohe Signifikanz auf. Zwischen dem Leerwert und beiden Schlauchtypen wurden eindeutige Anstiege gemessen (Leerwert 15,1MFI, heparinbeschichteter Schlauch 21,18MFI mit $p < 0,01$ gegen den Leerwert, PVC-Schlauch 26,29MFI mit $p < 0,01$ gegen den Leerwert). Auch der Vergleich des heparinbeschichteten Schlauchs mit dem PVC-Schlauch ergab ein hochsignifikantes Ergebnis ($p < 0,001$) in der univariaten Varianzanalyse.

Offensichtlich reagierten Lymphozyten und Granulozyten am stärksten auf den mit der Fremdoberfläche gebotenen Reiz. Beim Vergleich zwischen nicht nachaktivierten und nachaktivierten Analysen fiel das für die einzelnen Populationen gleich bleibende Reaktionsmuster auf.

Vergleich der Aktivierungsauswirkungen

Die Populationen reagierten unterschiedlich auf die Fremdoberfläche mit einer Verstärkung des oxidativen Bursts, wobei die Granulozyten die deutlichsten Unterschiede zwischen PVC und beschichteter Oberfläche zeigten.

Der Behandlung der Probenansätze mit PMA bzw. FMLP folgten geringe Fluoreszenzsignale während der Messung im Vergleich zur Messung des „nativen“ oxidativen Bursts. Mit der Nachaktivierung stiegen auch die Streuungen der Werte an. Bei Betrachtung der Box-Whisker-Plots fiel das kompaktere Feld der Messwerte gegenüber den Plots mit Nachaktivierung auf. Es ergaben sich somit durch die Nachaktivierung keine anderen Aussagen als bei der Messung des „nativen“ oxidativen Bursts. Weiterhin bestand die Frage, in wieweit der Boosteffekt durch die PMA/FMLP-Behandlung der Ansätze diese linear verstärkte, oder ob eine unregelmäßige Verstärkung der vorangegangenen Aktivierung folgte. Unter diesen Gesichtspunkten erscheint die Behandlung der Proben nach Entnahme aus dem ChandlerLoop mit PMA bzw. FMLP nicht sinnvoll. Der direkte Vergleich der Messungen trotz unterschiedlicher Methoden wird durch die Messung der Proben im gleichen Protokoll des Durchflußzytometers möglich, da die Geräteeinstellungen zwischen den verschiedenen Messungen des oxidativen Burst nicht verändert werden.

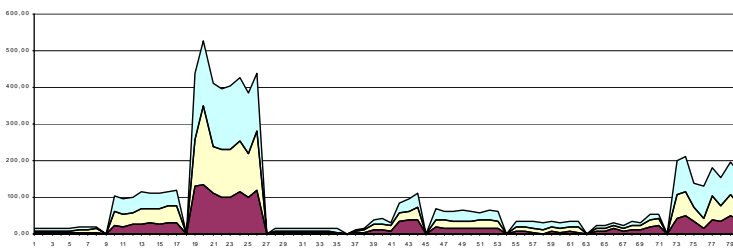


Abb. 4.1 : Übersicht der Auswirkung der Aktivierungsmethoden auf die MeanFluorescence-Intensität. 1.,2. und 3. Ausschlag von links entsprechen den Signalen der nativen Bestimmung des oxidativen Burst, drei Ausschläge in der Mitte der PMA- und drei Ausschläge rechts der FLMP-Nachaktivierung. Von vorne nach hinten entsprechen die Ausschläge den Populationen (vorne Lymphozyten, Mitte

Monozyten, hinten Granulozyten). Durch Darstellung aller Einzelmesswerte ist eine Achsenbeschriftung nicht möglich.

Bei der flowenzymologischen Bestimmung des oxidativen Bursts handelt es sich um ein relativ neues Verfahren. Burst-Untersuchungen wurden bisher in der Mehrzahl über Chemilumineszenz (Luminometer) gemessen. Mit Hilfe der Chemilumineszenz ließen sich Reaktionen des oxidativen Bursts auf verschiedene Materialien messen. Moore et al. demonstrierten einen Anstieg des Bursts auf Neutrophilen nach Kontakt der Zellen mit Hämodialysatoren aus Zelluloseacetat. Diese Reaktion ließ sich durch Nachaktivierung mit PMA / FMLP steigern (FLMP $p < 0,05$ gegenüber dem Leerwert) (53). Auch Kontakt mit methylierten Glasoberflächen riefen eine gesteigerte direkte Burstaktivität ohne Notwendigkeit einer Nachaktivierung hervor (Nygren et al. 2000, (57)). Andere Materialien reagierten ohne verstärkten Burst, wie Erikson et al. 2001 nachwies. Hier wurden Neutrophile mit Titanium-Oberflächen in Kontakte gebracht und nach 30min fand zwar eine Expression der Integrine (CD11B) statt, jedoch konnte keine spontane Burstaktivität gemessen werden.

Die Gründe, warum die Nachaktivierung geringere Messwerte lieferte, sind unklar. Da es sich um intrazelluläre Bestimmungen handelt und die sowohl die Antikörper, als auch das Reagenz zur Nachaktivierung in die vitale Zelle eingeschleust werden mussten, liegt die Vermutung einer Transportstörung oder eines Einflusses des Nachaktivierungsreagenzes auf die Vitalität der Zelle oder auf die Intaktheit der Enzymeinheit nahe. Die Vitalität der Zellen könnte durch Markierung mit Propidium-Iodid und anschließender durchflußzytometrischer Analyse geprüft werden.

Es ist bekannt, dass die Aktivität des oxidativen Bursts in Leukozyten und insbesondere in Granulozyten während der extrakorporalen Zirkulation mit unbeschichteten Schlauchsystemen ansteigt. Dies wurde von Toft et al. mit der Verdoppelung der Burst-Aktivität bei Patienten mit kardiopulmonaler Bypass-OP im Vergleich mit den Ausgangswerten festgestellt. Im gleichen Versuch wurde auch versucht, die Burst-Reaktion durch Gabe von Methylprednisolon zu mindern, was jedoch zu keinem Erfolg führte (77). Dass dennoch nicht jede körperfremde Oberfläche zu einer Aktivierung des Bursts führt beschrieb Gorbet et al., der nach Kontakt von Neutrophilen mit verschiedenen Fremdoberflächen, wie Zellophan,

Nylon, Polyethylen und Polydimethylsiloxilan, keine Änderung der Burstaktivität der Zellen feststellen konnte.

Die Literaturrecherche spiegelt die uneinheitliche Reaktion des oxidativen Bursts auf Fremdreize wieder, wobei nur eine äußerst geringe Anzahl an Beobachtungen über Zusammenhang der Burstaktivität mit dem Einsatz körperfremder Materialien vorliegen. Aus technischer Sicht ist die Einschleusung eines Substrats in die Zellen mit nachfolgend entstehender Fluoreszenzaktivität nach enzymatischem Umbau ein Erfolg versprechendes Prinzip. Außerdem kann eine hohe Sensitivität und Spezifität des Substrats angenommen werden, wenn weitere Vergleiche mit herkömmlichen Bestimmungsmethoden vorliegen. Die Messung des oxidativen Burst kann durch Bestimmung der Peroxide, die bei der Burstreaktions anfallen können, weiter ergänzt werden.

4.2.2.2 Kallikrein

Die „**native**“ **Kallikreinmessung** zeigte ähnliche Ergebnisse für alle Leukozyten-Populationen. Bei den Lymphozyten kam es zu einem Mittelwertanstieg der 120min Werte beider Schlauchtypen gegenüber dem Leerwert (Leerwert 7,8 MFI auf Heparin 8,6 MFI und PVC 11,24 MFI), der für den Vergleich zwischen Leerwert und dem PVC-Schlauch Signifikanz zeigte ($P=0,015$ im Student's T-Test, $p<0,001$ in der ANOVA). Der geringere Anstieg zwischen Leerwert und dem Heparinschlauch ist für die Hämkompatibilität des Schlauchs positiv zu bewerten.

In der Monozytengruppe kam es ebenfalls zu Mittelwertanstiegen beider Schlauchtypen gegenüber dem Leerwert, wobei der Werteanstieg zwischen Heparinschlauch und PVC-Schlauch stärker war, als bei den Lymphozyten und hier Signifikanz erreichte (Leerwert 15,5 MFI, Heparin 18,2 MFI, PVC 27,2 MFI, p zw. PVC und Heparin $<0,001$). Die Mediane folgten dem Verhalten der Mittelwerte.

Die Granulozytenpopulation zeigte signifikante Unterschiede zwischen beiden 120min Werten der Schläuche und dem Leerwert (Leerwert 26,4MFI, Heparin 35,3 MFI, PVC 39,3, p für Leerwert vs. PVC und Leerwert vs. Heparin $<0,01$). Im Vergleich beider 120min Werte wurde in der Varianzanalyse keine Signifikanz erreicht ($p=0,151$).

Für alle Vergleiche bestand Signifikanz von $p<0,00$ mit der Autofluoreszenz im Sinne einer positiven Kontrollfunktion für das Analyseverfahren.

Zusammenfassend war erkennbar, dass die Werte für Kallikrein gegenüber dem Leerwert immer ansteigend, und immer ein weiterer Anstieg der MFI zwischen dem heparinbeschichteten Schlauch und dem PVC-Schlauch beobachtet werden konnte, was bei den Lymphozyten und Monozyten stärker ausgeprägt war, als in der Granulozytengruppe.

Die **Kallikreinmessung mit PMA-Nachaktivierung** nach einer Rotationsdauer von 120min in den Schläuchen zeigte ein uneinheitliches Verhalten des Markers Kallikrein.

In der Lymphozytengruppe wurden zunächst steigende Mittelwerte zwischen Leerwert und Heparinschlauch, dann ein Abfall der MFI zwischen Heparin und PVC-Schlauch erfasst, der auch unter dem Leerwert lag (Leerwert 2,1 MFI, Heparin 5,7MFI, PVC 1,89 MFI). Der Anstieg zwischen Leerwert und Heparin wurde ebenso wie der Abfall zwischen Heparin und PVC als signifikant eingestuft.

In der Monozytenpopulation zeigten sich Anstiege vom Leerwert über den heparinbeschichteten Schlauch zum PVC-Schlauch (Leerwert 6,44MFI, Heparin 12,1MFI, PVC 47,56MFI), wobei in der ANOVA bei den Vergleichen der MFI zw. Leerwert und beiden Schlauchtypen, sowie zwischen den Schlauchtypen selbst Signifikanzniveau erreicht wurde.

Für die Granulozyten wurden abfallende Werte ermittelt (Leerwert 14,7MFI, Heparin 12,94MFI, PVC 8,7MF). Der Abfall der MFI zwischen heparinbeschichtetem Schlauch und PVC-Schlauch war mit $p < 0,001$ signifikant, ebenso bestanden Signifikanzen gegenüber dem Leerwert und beiden Schläuchen.

Bei der Bestimmung des **Kallikrein mit FLMP-Nachaktivierung** kam es bei den Lymphozyten zu einem leichten Anstieg der MFI-Mittelwerte vom Leerwert zum Heparinschlauch (Leerwert 5,0MFI, Heparin 6,46MFI) und zu einem etwas stärker Anstieg im PVC-Schlauch (PVC 10,0 MFI). Letzterer Anstieg wurde als hochsignifikant mit $p < 0,01$ eingestuft, wobei auch die Vergleiche der Schläuche mit dem Leerwert Signifikanz erreichten.

Bei den Monozyten fand ein Abfall der Kallikrein-Werte vom Leerwert mit einer MFI von 44,4 auf 25,2 MFI und 24,5MFI für Heparin- und PVC-Schlauch statt.

Bei insgesamt hoher Streuung der Messwerte wurde im Granulozyten-Gate ein etwa gleiches Niveau der Mediane für die MFI von Leerwert (11,35), Heparinschlauch (15,1) und PVC-Schlauch (14,5) gefunden.

Die **Nachaktivierung der Proben für 5 Stunden** durch Bebrütung nach der Rotation, sowie des Leerwerts ergab für die Lymphozyten keine ansteigende Werte für Kallikrein des Heparin-Schlauchs gegenüber dem Leerwert, sowie eine Steigerung der MFI zwischen den Heparin- und PVC-Schlauch (Leerwert 2,96MFI, Heparin 3,03 MFI, PVC 5,0MFI). Der Vergleich der MFI zwischen Leerwert und PVC, sowie zwischen Heparinschlauch und PVC-Schlauch wurde mit $p < 0,01$ signifikant gewertet.

Für Monozyten und Granulozyten ergab sich ein klareres Bild : Im Monozyten-Gate wurde eine kontinuierliche Steigerung der MFI-Mittelwerte bei geringer Streuung der Messwerte vom Leerwert (6,47MFI) über den Heparinschlauch (8,02MFI) zum PVC-Schlauch (9,97MFI) festgestellt. Alle gemessenen Unterschiede waren hierbei mit $p < 0,001$ signifikant.

Ein gleiches Bild zeigte sich bei den Granulozyten mit einer Steigerung vom Leerwert (6,69MFI) über den Heparinschlauch (11,5MFI) zum PVC-Schlauch (16,51MFI). Hier bestanden ebenfalls Signifikanzen ($p < 0,01$).

Bewertung der Kallikreinbestimmungen

Um die Messergebnisse zu beurteilen ist eine Darstellung aller Messwerte hilfreich. Mit dem Hintergrund, dass alle Messungen mit den gleichen Geräteeinstellungen und dem gleichen Messprotokoll durchgeführt wurden, fällt auf, dass keine Verstärkung der Enzymaktivierung während der Rotation durch die Nachaktivierungsmaßnahmen PMA, FMLP und Bebrütung angenommen werden kann. Da sich als Gegenteil die Messwerte erniedrigen, sollten Gründe für das Verhalten des Markers gefunden werden.

Insbesondere erschien die Streuung der Messwerte bei der PMA-Nachaktivierung inakzeptabel. Die Ergebnisse sind in dieser Form unerwartet. Erwartet wurde ein Booster der Enzymaktivierung in den Loops während der Rotation um voneinander deutlicher abgrenzbare Messwerte zwischen den Schlauchtypen zu erhalten. Es konnte jedoch nicht vorhergesagt werden, wie sich die Aktivierungsreagenzien auf die Enzymfunktion auswirken würden. In der Literatur wurde die Behandlung von Zellen mit PMA- und FMLP-Aktivatoren sowohl nachfolgend auf einen primären Reiz zur Verstärkung dessen, als auch als einzige Aktivierung gegenüber Zellen angewendet. Wären die Aktivierungsreagenzien in der Lage einen Maximalreiz auf

die Zellen mit nachfolgend starker Enzyminduktion auszuüben, wäre dies zumindest als Positivkontrolle für Versuche verwendbar. Von einer linearen Verstärkung der Voraktivierung kann nicht ausgegangen werden.

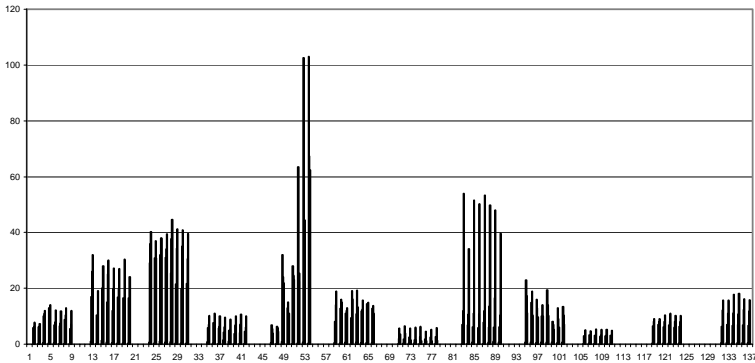


Abb. 4.2 : Darstellung aller Messwerte für Kallikrein, jeder Balken stellt einen Messwert dar. Blöcke 1-3 = Kallikrein „nativ“ mit Leerwert/Heparin/PVC, Blöcke 4-6 = Kallikrein mit PMA-Nachaktivierung mit Leerwert/Heparin/PVC, Blöcke 7-9 = Kallikrein mit FLMP-Nachaktivierung mit Leerwert/Heparin/PVC und Blöcke 10-12 = Kallikrein mit nachfolgender Bebrütung (Leerwert/Heparin/PVC).

Ähnlich wie bei der Nachaktivierung des oxidativen Burst (mit einem ähnlich heterogenen Bild der Messergebnisse), ist die Frage zu stellen, in wieweit die Aktivoren die Möglichkeit haben, eine Enzyminduktion zu bewirken. Dies stellt sich auch vor dem Hintergrund, dass die Integrität der Zellmembran für die Einschleusung der CellProbe-Reagenzien gestört werden muss (Löcherung der Membran durch den Permeabilisierungsvorgang) und wie sich diese Strukturveränderung auf den Einstrom der Aktivoren während deren Inkubation mit den Zellen auswirkt. Hierbei ist eine massive Störung der Vorgänge in der lebenden Zelle durchaus denkbar. Als Lösungsansatz sollte die Vitalität der Zellen entweder mit Apoptose-Markern (Annexin V) oder Propidium-Iodid (PI) getestet werden. Weiterhin wäre eine direkte Kontrolle der Kallikreinwerte durch Messung im Plasma durch humorale Bestimmungsansätze sinnvoll. Von den eingesetzten Methoden der

flowenzymologischen Kallikrein-Bestimmung wird hier nur die „native“ Kallikreinmessung (ohne Nachaktivierung), sowie die Nachaktivierung der Zellen nach der Rotation durch Inkubation als vertrauenswürdig gefunden, da bei beiden Methoden außer der Messung keine weiteren Manipulationen an den Zellen vorgenommen werden, wobei die Nachaktivierung als durchaus „physiologisch“ angenommen wird. Bei subjektiver Betrachtung erscheint eine Verstärkung der Aktivierung am wahrscheinlichsten im Monozyten-Gate bei PMA-Nachaktivierung vorzuliegen.

Die Wirkungen von des Kallikrein und Faktor XII auf die intrinsische Gerinnung, die Fibrinolyse und das Komplement können durch heparinbeschichtete Oberflächen reduziert werden. Die Messwerte der „nativen“ Kallikreinmessung lassen den Schluss zu, dass die Heparinbeschichtung die Kontaktphasenaktivierung günstig vermindert. Bisher durchgeführte in-vitro Bestimmungen der Kallikreinaktivität nach Fremdoberflächenkontakt basierten auf Immunoassays, die eine Umwandlung von Z-Lys-Phe-Arg-pNA^o2HCl bewirkten, zu dem der Faktor XII_f und Kallikrein hohe Affinität zeigen. Um zu klären, durch welche der Serin-Proteasen das Substrat gespalten wurde, erfolgte die Zugabe von Aprotinin, einem Protaseinhibitor, in einen der Ansätze (80) . Hier werden die Vorteile der direkten Messung der Kallikreinaktivität durch die CellProbe-Analysemethode deutlich, die eine hohe Spezifität gegenüber Kallikrein besitzen. Van der Kamp et al. maßen die Aktivität von Kallikrein nach Glas-, Polyethylen- und Polydimethylsioxan-Kontakt mit Blut und fanden die höchste Kallikrein / Faktor XII_f – Bildung auf Glas und Polyethylen (80) (Plasmakallikrein nach Glaskontakt 5,63+/-0,55, nach Polyethylenkontakt 0,83+/-0,33 nmol pNA/min x cm²). Sie postulierten, dass die Kallikrein-Aktivierung auf hydrophoben Oberflächen erhöht sei und fanden Polyethylen als geeignetste hämokompatible Oberfläche.

Bei Patienten, die einer EKZ während einer Herzoperation unterzogen wurden, fanden Wendel et al. 1999 einen signifikanten Anstieg der Faktor XII_a-like- und Kallikrein-like-Aktivität gegenüber gesunden Probanden und schlossen daraus auf eine Aktivierung des Faktor-XII_a-Kallikrein-Kaskade während einer extrakorporalen Zirkulation, wobei keine Verbindung zur Biokompatibilität von verwendeten Kunststoffen hergestellt wurde (86) . Eine weitere Möglichkeit die Kallikreinaktivität indirekt zu messen besteht über die Detektion von Kallikrein-C1-Inhibitor-Komplexen.

Hier wurden Studien über Hämokompatibilitätsvorteile eines heparinbeschichteten Schlauchsystems 1997 von Te et al. vorgenommen mit dem Ergebnis dass bei Heparinbeschichtung im Vergleich zu unbeschichteten Systemen das Auftreten der Inhibitor-Komplexe um 43% ($p=0,026$) nach Einsatz der EKZ abnahm (7) . Die Reaktivierung von Kallikrein-C1-Inhibitor-Komplexen lässt sich auch durch Gabe von Kallikrein-Inhibitoren (Aprotinin) während der EKZ reduzieren (8) . Weitere Möglichkeiten, die Kallikreinaktivität zu erfassen liegen in der Detektion eines Abfalls der Kallikreinvorstufe Präkallikrein, die ebenfalls mit kommerziellen Kits durchführbar ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Aussagekraft des Kallikreinwerts hinsichtlich der Hämokompatibilität eines Materials noch nicht vollständig geklärt ist. Die physiologischen und auch pathophysiologischen Folgen einer Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems scheinen jedoch weitreichend und mit einer Reihe von anderen Systemen der Hämostase verzahnt zu sein, weswegen diesem Marker besonders Augenmerk gegeben wird. Als direkte Detektionsmethode ist die Flowenzymologie für Kallikrein sicherlich vielversprechend. Statt einer Nachaktivierung der Proben zur Erhöhung der Trennschärfe der Ergebnisse sollten Schritte in eine Optimierung der Methode und eventuell ein stärkeres Signal gelenkt werden. Die angewendete Methode sollte in klinischen Untersuchungen bei EKZ-Bedingungen mit unterschiedlichen Oberflächen weiter getestet werden.

4.2.2.3 Peroxide

Die Peroxide zeigten in allen Leukozytenpopulationen eine einheitliche Reaktion auf den Kontakt mit den Oberflächen der beiden Schläuche.

Für die Lymphozyten wurden ansteigende Mittelwerte und ansteigende Mediane vom Leerwert (3,5MFI) über den Heparinschlauch (7,7MFI) zum PVC-Schlauch (12,5MFI) gefunden. Neben einem signifikanten Abstand der Werte zur Autofluoreszenz zeigten sowohl die Mittelwertvergleiche zwischen Leerwert und beiden Schläuchen, sowie der Vergleich zwischen beschichtetem und unbeschichtetem Schlauch ein hohes Signifikanzniveau mit $p<0,001$.

Dieses Ergebnismuster setzte sich bei den Monozyten fort mit gleichartig ansteigenden Werten (Leerwert 4,3MFI, heparinbeschichteter Schlauch 9,3MFI,

PVC-Schlauch 18,7MFI). Es bestanden signifikante Unterschiede im Student's T-Test und in der ANOVA bei allen Vergleichen.

In der Granulozytenpopulation glichen die Messwerte denen der Monozyten mit einem Leerwert von 2,67MFI, Heparin 10,2MFU und PVC 17,840. Bei geringer Streuung der Messwerte bestätigten beide statistischen Analysen das hohe Signifikanzniveau mit $p < 0,001$.

Das Entstehen von, aus H_2O_2 ableitbaren, Sauerstoffverbindungen, während der extrakorporalen Zirkulation wird im Zusammenhang mit schädigenden Einflüssen dieser Oxidationsprodukte auf den Patienten beobachtet. Die auch als Superoxide bezeichneten Stoffe zeigten bereits in früheren Arbeiten steigende Werte beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine, mussten jedoch teilweise über indirekte Methoden bestimmt werden (quantitative Katalase-Bestimmungen). Die Peroxide stiegen zu Beginn der EKZ an und blieben bis 12 Stunden postoperativ auf erhöhtem Niveau (37) (55). Um den Einfluß der Superoxidproduktion polymorphonukleärer Leukozyten auf die EKZ-assoziierten Organschädigungen zu beleuchten, stellten Schwartz et. al 1998 die These der Priming-Funktion der EKZ auf die Leukozyten vor. Sie besagt, dass ein während des EKZ gesetzter Reiz die Leukozyten postoperativ zu erhöhter Superoxidproduktion anregt. Die Studie fand eine erhöhte O_2^- -Produktion in einem Zeitfenster 6 Stunden nach der EKZ (66). Gemeinsam mit der Beobachtung erhöhter Plasmaspiegel von inflammatorischen Mediatoren (C3a, IL-6, IL-8) vermuteten sie einen Prädispositionsmechanismus für eine folgende Organdysfunktion durch das „Priming“ der Leukozyten.

Untersuchungen der Hämokompatibilität von Fremdoberflächen über den Ansatz Peroxidase wurden in der Literatur selten veröffentlicht. Nachgewiesen wurden erhöhte Peroxidproduktion für den Blutkontakt mit Polyurethan, Dacron® und Velcro® (34). Diese Untersuchung wurde auch kinetisch bewertet und zeigte, dass die Superoxidproduktion in den ersten 10min nach EKZ-Einsatz den höchsten Anstieg aufweist (33).

Eine frühere Studie von Cavarocci et al. fand neben einer erhöhten Komplementaktivierung bei EKZ-Einsatz auch eine gesteigerte Plasmakonzentration von H_2O_2 (10).

Der verminderte Anstieg der Peroxide bei Einsatz einer heparinbeschichteten Fremdoberfläche im Vergleich zur PVC-Oberfläche wird demnach als positiv im

Sinne der Hämokompatibilität gesehen und die Bestimmung durch Flowenzymologie als direkte Detektionsmethode ist viel versprechend. Dennoch sind weitere Untersuchungen mit Hilfe dieses Tests unter klinischen Bedingungen und unter Einbeziehung weiterer Fremdoberflächen notwendig, um die Aussagekraft des Markers beurteilen zu können.

4.2.2.4 Elastase

4.2.2.4.1 RGES-Elastase

In der Lymphozytenpopulation wurde ein schwacher Anstieg der MFI-Mittelwerte zwischen dem Leerwert und dem heparinbeschichteten Schlauch mit nachfolgendem weiterem Anstieg zum PVC-Schlauch beobachtet (Leerwert 0,63MFI, Heparin 1,68MFI, PVC 5,92MFI). Diese Werteanstiege sind signifikant mit $p < 0,01$ in der ANOVA.

Die Monozyten reagierten stärker auf die Aktivierung während der Rotation und steigerten die MFI für RGES-Elastase vom Leerwert (5,45MFI) über den Heparinschlauch (13,18MFI) zum PVC-Schlauch hin (20,8MFI). Auch hier erreichten alle Vergleiche der Mittelwerte ein hohes Signifikanzniveau von $p < 0,001$.

Für die Granulozytenpopulation ergab sich ein ähnliches Bild wie für die Lymphozyten mit insgesamt leicht erhöhter Fluoreszenzintensität. Neben dem Leerwert mit einer MFI von 1,5 kam es zu einem geringen Anstieg der Mittelwerte für den Heparinschlauch (2,13MFI) und einem stärkeren Anstieg für den PVC-Schlauch (6,075MFI). Die Vergleiche aller Werte untereinander zeigen Signifikanz.

4.2.2.4.2 AAPV-Elastase

Die Mittelwerte der AAPV-Elastase zeigen für die Leukozytenpopulationen jeweils ansteigende Tendenz (Leerwert < Heparin < PVC). Für die Lymphozyten kam es bei einem Leerwert von 4,04MFI zu einem geringen Anstieg der MFI beim Heparinschlauch (4,43) und zu einem deutlicheren Anstieg des PVC Schlauchs (6,2MFI).

Bei den Monozyten zeigten sich Anstiege gegenüber des Leerwerts (22,2MFI) zum Heparinschlauch mit 25,2MFI und stärker ausgeprägt zum PVC-Schlauch mit 35,9MFI. In der Granulozytenpopulation wurde dieser Anstieg gleichmäßiger

beobachtet (Leerwert 11,28MFI, Heparin 15,4MFI, PVC 21,1MFI). Die Vergleiche der Mittelwerte zwischen Leerwert und heparinbeschichtetem Schlauch bzw. PVC-Schlauch, sowie zwischen Heparinschlauch und PVC-Schlauch wiesen in allen Leukozytenpopulationen Unterschiede auf hohem Signifikanzniveau ($p < 0,001$) auf.

4.2.2.4.3 Zusammenfassung Elastase

Bei den Elastasebestimmungen handelt es sich um Elastasen die durch Umsetzung verschiedener Substrate in fluoreszenzaktive Stoffe voneinander differenziert werden können. Die Freisetzung aktiver Elastase erfolgt nach entsprechender Reizung aus neutrophilen Granulozyten oder beim Zerfall dieser Zellen aus deren Granula. Zum einen wird AAPV (Ala-ala-pro-val), zum anderen RGES (Arg-gly-glu-ser-Rho110) als Substrat verwendet. Bisherige Untersuchungen mit kommerziell erhältlichen Kits bezogen sich hauptsächlich auf die PMN-Elastase (Poly-morpho-nukleäre Elastase) der neutrophilen Granulozyten.

Es ist bekannt, dass die Aktivität der Elastasen in inflammatorischen Zuständen, zu denen in weiterem Sinne auch die extrakorporale Zirkulation gehört, zunehmen. Tayama et al. fanden 2000 in einem in-vivo Vergleich zwischen heparinbeschichteten und unbeschichteten Systemen bei EKZ erhöhte Spitzenwerte für Elastase der Neutrophilen, die aber bei Einsatz der Heparinbeschichtung deutlich reduziert waren. Für diese Studie kam die Carmeda Bioactive Surface – Beschichtung zur Anwendung, mit der auch die Schläuche der vorliegenden Arbeit beschichtet waren. (73) . Niedrigere Elastase-Aktivierungen wurden auch von Wendel et al. im Jahr 2000 beobachtet, der in einem in-vitro Versuch bei heparinbeschichteten Systemen signifikant niedrigere Elastasewerte fand, als in der unbeschichteten Kontrollgruppe (87) . Dass der Einsatz einer EKZ ohne Beschichtung mit erhöhten Elastasewerten einhergeht wurde von Acione et al. im Jahr 2000 bestätigt. Hier wurden bei einem Vergleich von Patienten mit und ohne EKZ für die Elastasekonzentrationen ein hohes Signifikanzniveau gefunden ($p < 0,001$) (4) . Der positive Effekt der Heparinbeschichtung konnte jedoch nicht durch weitere Zugabe von Inhibitoren, wie Aprotinin, verbessert werden – es konnten von Defraigne et al. keine additiven Effekte im Sinne einer verminderten inflammatorischen Aktivierung festgestellt werden (13) . Für die Hämokompatibilitätstestung anderer Beschichtungen (Silikon) für Oxygenatoren konnten zwar Anstiege der Elastasewerte ($p < 0,05$) gemessen

werden, ein Unterschied zwischen unbeschichtetem und silikonbeschichtetem System konnte jedoch nicht erfasst werden (82). Da die Heparinpräsenz offenbar eine verminderte Aktivierung der Granulozyten bewirkt, stellt sich die Frage, oxidativen Burst gleichartige Effekte durch das in der Beschichtung der Schläuche als Festphase gebundene Heparin auch durch eine erhöhte systemische Gabe von Heparin bei Verwendung unbeschichteter Systeme vorliegen. Dies wurde in einem Simulationsmodell getestet. Hinsichtlich der Elastaseaktivität scheint dies nach Bannan et al. nicht der Fall zu sein, denn die Messwerte für Elastase steigen bei systemischem Heparineinsatz stärker an, als bei kovalenter Beschichtung (30min Zirkulation 570 vs. 145 Mikrogramm/l, $p < 0.01$, 60min Zirkulation 646 vs. 278 Mikrogramm/l, $p < 0.01$, 120 min Zirkulation 613 vs. 403 Mikrogramm/l, $p < 0.05$) (5). Nach Literaturrecherche erscheint Elastase als gut untersuchter und zuverlässiger Marker für die Aktivierung von Zellen durch Fremdoberflächen. Der Vorteil der Heparinbeschichtung mit erniedrigter Aktivierung durch niedrigere Elastasewerte wurde auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Hervorzuheben ist als Unterschied zu anderen Studien jedoch der neue Analyseansatz durch die Flowenzymologie an lebenden Zellen im Gegensatz zu Plasmabestimmungen der PMN-Elastase. Die Handhabung der CellProbe-Methoden erwies sich als unkompliziert und zuverlässig mit konstanten Messergebnissen. Die Aussagekraft der Methode scheint durch die Literaturangaben verwendbar zu sein, es fehlen jedoch die Vergleiche der Messergebnisse in einer klinischen Studie an Patienten. Von Vorteil wäre auch die Einführung einer Positivkontrolle durch chemische Maximalaktivierung der Zellen im Ansatz.

4.2.3 Interleukine IL1- β , IL-2, TNF- α

Durch die eng mit anderen Signalsystemen verzahnten Wirkeigenschaften der Interleukine und die weitreichenden lokalen und systemischen Auswirkungen dieser Botenstoffe, rückte die Stoffklasse näher ins Zentrum der Beobachtungen zur Hämokompatibilität von Fremdoberflächen. Der Stellenwert der Interleukine im Rahmen von nach EKZ auftretenden pathophysiologischen Vorgängen ist als außerordentlich hoch einzustufen.

4.2.3.1 Interleukin 1

In der Lymphozytengruppe wurden für Interleukin-1 β zwar ansteigende Werte nach 120min Aktivierung während der Rotation der Loops von der Autofluoreszenz (0,079MFI) über das Negative Staining (0,211MFI), Leerwert (0,348MFI), Heparinschlauch (1,292MFI) zum PVC-Schlauch (1,878MFI) gefunden, die Werte bewegten sich aber insgesamt auf sehr niedrigem Fluoreszenzniveau. Zudem bestanden keine Signifikanzen zwischen dem Leerwert und der Autofluoreszenz, bzw. dem Negative-Staining-Wert in der ANOVA, wogegen der Student's-T-Test die Vergleiche Leerwert vs. Heparin, Leerwert vs. PVC und Heparin vs. PVC mit $p < 0,01$ gewertet wurden.

Die Monozyten zeigten ebenfalls einen Anstieg wie die Lymphozyten, jedoch auf einem etwas höheren Fluoreszenzniveau (Auto 0,341MFI, NS 0,947MFI, Leerwert 2,86MFI, Heparin 3,3MFI, PVC 3,8MFI). Sowohl ANOVA, als auch der Student's-T-Test bewerteten die Mittelwertabstände als hochsignifikant mit $p < 0,01$.

Deutliche Unterschiede zeigten sich dagegen bei den Granulozyten, bei denen auch ein ausreichend sicherer Abstand zwischen Autofluoreszenz (0,787MFI), NS (1,68MFI) und dem Leerwert (30,494MFI) bestand. Gegenüber dem Leerwert kam es zu gering ansteigender MFI für die Heparinbeschichtung (32,98MFI) und einem stärkeren Anstieg der MFI für IL-1 β im PVC-Schlauch (43,183MFI). Die Signifikanzgrenze von $p < 0,01$ wird in der ANOVA bei MW-Vergleich zwischen Leerwert und PVC erreicht, nicht jedoch zwischen Leerwert und Heparin, was positiv im Sinne der Hämokompatibilität zu werten ist.

4.2.3.2 Interleukin 2

Im Lymphozytengate wurden bei äußerst niedrigem MFI-Niveau zwar veränderte Werte in den Proben aus den Schläuchen und dem Leerwert gegenüber Autofluoreszenz und NS erfasst, die Messungen sind aufgrund der eng beieinander liegenden Werte nicht vertrauenswürdig.

Für die Monozyten kommt es mit insgesamt leicht stärkeren MFI bei den Schläuchen ebenfalls nur zu geringeren Unterschieden der MFI zwischen Proben aus den Schläuchen. Signifikante Unterschiede werden dabei nicht erreicht, jedoch beim Vergleich zwischen Autofluoreszenz, NS und allen anderen Proben.

In der Granulozytenpopulation wurden keine Unterschiede zwischen Leerwert, heparinbeschichtetem Schlauch und PVC-Schlauch gefunden. Die Interleukin-2-Bestimmungen blieben insgesamt ohne aussagefähiges Ergebnis.

4.2.3.3 Tumor-Nekrose-Faktor- α

In den Lymphozyten- und Monozytenpopulationen wurden bei insgesamt niedriger MeanFluorescence-Intensität keine Unterschiede zwischen Leerwert, heparinbeschichteter Oberfläche und PVC-Schlauch gefunden.

In der Granulozytenpopulation kam es zu einem diskreten Ansteigen der MFI zwischen Leerwert (3,58MFI) und Heparinbeschichtung (3,688MFI), sowie zu einem weiteren Anstieg in den Proben aus dem PVC-Schlauch (4,117 MFI).

Der Mittelwertvergleich zwischen heparinbeschichtetem Schlauch und PVC-Schlauch wurden von ANOVA und Student's-T-Test als signifikant eingestuft ($p < 0,01$), was ebenso für den Vergleich der MW zwischen Leerwert und PVC-Schlauch zutrifft. Die fehlende Signifikanz zwischen Leerwert und Heparinbeschichtung kann für die Hämokompatibilität der Carmeda-Beschichtung als positiv bewertet werden.

4.2.3.4 Bedeutung der Zytokine

Der Einsatz heparinbeschichteter Systeme in der extrakorporalen Zirkulation reduziert die Komplementaktivierung und Fibrinolyse. Der Einfluß der Beschichtung der Systeme auf die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wurde bisher jedoch nur selten untersucht.

Der Tumornekrosefaktor- α spielt eine wichtige Rolle in der Abwehrreaktion des Körpers gegenüber schädlich einwirkenden Reizen und ist, wie auch die Zytokine IL-1 β und IL2, eng mit den Antwortmechanismen des Komplements und der zellulären Abwehr verzahnt. Die frühe, exzessive Freisetzung von TNF während der EKZ führt jedoch zu einem „Zytokin-Sturm“ im Regulationssystem, von dem aus eine Begünstigung für die Entstehung einer systemischen inflammatorischen Reaktion ausgehen kann (SIRS-Promotion). Hierbei triggert freigesetztes TNF- α eine Konformationsänderung der Adhäsionsepitope (Selektine) auf Neutrophilen und auf Zellen des Endothels. Dieser Vorgang wurde bereits bei den Markern CD11B und CD11C, bzw. CD18 in dieser Arbeit beobachtet. TNF- α stellt für Neutrophile einen

äußerst starken Reiz, der zu hoher Ausschüttung aktiver Enzyme wie Elastase führt (siehe Ergebnisse AAPV-/RGES-Elastase) und wird aus diesem Grund auch für in-vitro-Versuche als alleiniges Aktivans für Leukozyten verwendet. Er wirkt ebenfalls als endogener Mediator der Neutrophilen-Migration während einer systemischen inflammatorischen Antwort. Dies wurde durch die Beobachtung belegt, dass es nach Applikation von TNF- α an Patienten, nach einer Neutropenie zu einer Neutrophilie durch Migrationsvorgänge kommt (79) .

Der positive Effekt einer niedrigeren TNF- α -Freisetzung bei Verwendung einer heparinbeschichteten Oberfläche wurde 1996 von Yamada beobachtet. Während EKZ stiegen die TNF- α -Konzentrationen im Plasma signifikant schwächer an, als in der unbeschichteten Kontrollgruppe (91) . Auch im Tierversuch wurde erkannt, dass in einem Simulationsmodell einer extrakorporalen Zirkulation bei Hasen bei Heparinbeschichtung ein TNF- α -Anstieg im Gegensatz zum unbeschichteten System nicht auftrat (60). Diese Ergebnisse wurden jedoch von anderen Studien nicht geteilt. Steinberg et al. verglichen während EKZ ebenfalls eine Heparinbeschichtung gegen unbeschichtetes Material und konnten keine Unterschiede feststellen (68) . Es wurde ferner vermutet, dass die TNF- α -Anstiege durch Scherkräfte auf die Zellen bei Verwendung von verschiedenen Pumpensystemen beeinflusst wurden. Diese Ansicht wurde von Sao 1995 (65) abschlägig beurteilt, der die TNF- α -Konzentration beim Einsatz von Roller- und Zentrifugalpumpen gleichbleibend erfasste. Dies wurde 1996 von Pomianek bestätigt, der zusätzlich zu den Scherkräften Nachaktivierung (S.epididermidis) einsetzte. Dass in-vivo die TNF- α -Konzentration im Patientenblut zunimmt bleibt allerdings unbestritten (46) .

Für die Zytokine Interleukin-1 β und Interleukin-2 liegen ebenfalls unterschiedliche Studien vor, die in ihrer Gesamtheit kein eindeutigen Muster für das Verhalten der Marker in Bezug auf den Beschichtungsvorteil von Materialien ausweisen.

Interleukin-1 β ist für die Materialforschung wegen seiner vielfältigen Wirkungsmechanismen von besonderem Interesse. Erhöhte IL-1 β -Präsenz zieht Fieber, Leukozytose und die Produktion von Akute-Phase-Proteine nach sich. Außerdem werden durch den IL-1 α -Einfluss vermehrt Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektine von Endothelzellen bereitgestellt, was zu einer Aggregation von Neutrophilen und Monozyten führen kann, die ihrerseits weitere Kaskaden auslösen. Die Wirkung von IL-1 β und TNF- α ähnelt sich hinsichtlich der

Aggregationsförderung von Leukozyten und der Aktivierung dieser mit nachfolgender Degranulation. Steingerg et al. konnten 1995 keine Unterschiede zwischen beschichtetem und unbeschichtetem Material während EKZ feststellen (68). Bei unbeschichteten Simulationsmodellen wurde allerdings eine sign. Erhöhung der IL-1 β -Konzentration festgestellt (2) (22) .

Die steigende Präsenz von Interleukin-1 β während realer EKZ steht jedoch fest (46). Die Literaturrecherche für Interleukin-2 zeigte, dass sehr wenige Daten zu diesem Marker bestehen. Bei Sao's Versuch, die proinflammatorische Antwort der Mediatoren auf EKZ zu erfassen, wurde IL-2 nur inkonstant erhöht erfasst und es konnten keine sign. Unterschiede erzielt werden. IL-2 scheint dabei ein träges Antwortverhalten auf Aktivierungsreize zu zeigen, da auch ein vierstündiger Fremdoberflächenkontakt des Bluts während Dialyse keinen Einfluss auf die Expression hatte. In der gleichen Studie konnte jedoch auch eine signifikante IL-2-Präsenz gegenüber dem Ausgangswert bei 18-stündiger Puma-Aktivierung (!) von Blut gefunden werden (Rostaing et al. 2000 (64) . Obgleich der Nutzen des Markers IL-2 für die Hämokompatibilitätsvorhersage von Fremdmaterialien nicht abzuschätzen ist, scheinen zum gegenwärtigen Zeitpunkt andere Marker besser geeignet zu sein (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α).

Die Bereitschaft Zytokine aufgrund Reizen während EKZ freizusetzen ist möglicherweise interindividuell stark unterschiedlich. Aus diesem Grund sind größere Fallzahlen notwendig um die Ergebnisse zu konsolidieren.

Hervorzuheben ist, dass es sich bei den Interleukinen um eine de-novo-Synthese auf Aktivierungsreize handelt. Aus diesem Grund kann es zu verzögerten Anstiegen der Konzentrationen kommen und es wäre von Vorteil, dies mit einer Kinetikstudie der Freisetzung zu untersuchen. Die Studien der Vergangenheit wurden über indirekte Bestimmungsmethoden für Zytokine durchgeführt, wohingegen es sich in der vorliegenden Arbeit um direkte Ansätze handelt. Die gefundenen Ergebnisse spiegeln die Erfahrungen anderer Studien mit den Markern wieder. Zusammenfassend ist Rolle der Zytokine weiterhin unklar, es sind jedoch Schlüsselfunktionen für die Abläufe im Rahmen der Hämokompatibilität zu vermuten, die weiterer Klärung bedürfen.

4.2.4 Heat Shock Protein HSP 70

Die Messung des HeatShockProteins 70 hatte in der vorliegenden Arbeit experimentellen Charakter. Es handelt sich um ein Protein, welches im Rahmen von Stressreaktionen der Zelle nachweisbar wird und erst seit kurzer Zeit durch die Bereitstellung geeigneter Nachweisverfahren und -Reagenzien ins Interesse der Hämokompatibilitätsforschung stieß. Die Kopplung des Antikörpers mit einem durchflußzytometrischen Sekundärantikörper stellte einen neuen methodischen Ansatz dar.

Für die Messung des HeatShockProtein70 wurden nur gering ansteigende MeanFluorescence-Intensitäten vom Leerwert auf die an der Rotation teilgenommenen Schläuche gemessen. Teilweise sank die MFI des PVC-Schlauchs gegen den heparinbeschichteten Schlauch leicht ab (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten). Trotz Signifikanz zwischen NegativeStaining sowie Autofluoreszenz und allen anderen Bestimmungen (positive Kontrollfunktion für die Methode) und einzelnen signifikanten Vergleichen zwischen Leerwerten und Schlauchtypen können die Unterschiede zwischen den Schlauchtypen auf diesem Fluoreszenzniveau nicht als bedeutend gewertet werden.

Gründe für die geringen Unterschiede können in einer mit 120min zu kurzen Rotationsdauer der Loops liegen (zu schmales Aktivierungszeitfenster). Hier wären Untersuchungen mit längeren Rotationszeiten der Loops zu fordern. Auch eine Nachaktivierung, als Booster für die während der Rotation eingetretene Aktivierung, mit geeigneten Aktivatoren wäre wünschenswert. Weitere Sicherheit in methodischer Hinsicht würde die Bereitstellung eines bereits mit Fluorochromen konjugierten HSP70-Antikörpers bringen um während des Prozesses der Sekundärmarkierung, wie hier vorgenommen, weitere Manipulationen der Zellen und des Antikörpers zu umgehen. Untersuchungen mit HSP70 wurden bisher in der Mehrzahl mittels Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) vorgenommen. Dieser Ansatz weist mRNA für HSP70-Trasskipte in den Untersuchungsansätzen bei einer äußerst geringer Nachweisgrenze nach. Eine Untersuchung nach dieser Methode ergab bei Weber et al. im Jahr 2001 keine Unterschiede zwischen verschiedenen Beschichtungen und Materialien in einem closed-loop in-vitro Modell (84) mit der Schlussfolgerung, dass die Aktivierungszeiten auf die Zellen im Modell zu kurz sein könnten.

Für HSP70 werden zell- und organismusprotektive Fähigkeiten vermutet. Eine Induktion des Markers wurde während Ischämie und Trauma beobachtet. In experimentell simulierten ischämischen Situationen für Myokardzellen korrelierte die

HSP70-Präsenz mit einer Verkleinerung des Infarktgebietes, einer Verbesserung der myokardialen Funktion und Erholung geschädigten Endothels (71) .

Literaturquellen für den Marker im Zusammenhang mit der Biokompatibilität von Oberflächen oder des Verhaltens bei der extrakorporalen Zirkulation sind bisher kaum vorhanden. HSP70 ist nicht zuletzt wegen des offenbar protektiven Potentials Ziel weiterer Studien. HSP70-Antikörper erscheinen aber zum jetzigen Zeitpunkt für die Untersuchung der Hämokompatibilität für Fremdoberflächen mit kurzen Aktivierungszeiten eher wenig geeignet. Eine Evaluation der methodischen Ansätze zur Bestimmung (Durchflußzytometrie vs. PCR) erscheint sinnvoll, da die Nachweisgrenze des Markers wahrscheinlich eher im Genbereich erreicht werden kann.

4.2.5 Thrombozytenstudien

4.2.5.1 CD41-Markierung aus Thrombozyten

Für den Oberflächenmarker CD41 auf Thrombozyten kam es wie erwartet zu einem Abfall der MFI für CD41 mit zunehmender Aktivierung der Zellen. Gegenüber dem Leerwert (1,368MFI) sinkt das Signal über den beschichteten Schlauch (1,181MFI), PVC-Schlauch (0,736MFI), die ADP-Nachaktivierung (0,814MFI) zur maximalen Aktivierungsform mittels zum Blut zugegebenen Glasperlen (0,766MFI) ab.

Die Markierung der Plättchen mit CD41 gehörte zu den Kontrollversuchen für die weiteren Thrombozytenstudien. Die Veränderungen der MFI wurden wie erwartet beobachtet. Der Abfall der Markierungssignale mit zunehmender Aktivierung kann mit der zunehmenden Aggregation von Plättchen an Leukozyten (diese werden im Thrombozytengate nicht erfasst) oder an andere Thrombozyten selbst erklärt. Im letzteren Fall werden diese Thrombozytenaggregate wegen ihrer Größe nicht mehr erfasst – es kommt gleichsam zum „Verlust“ von Plättchen für die Zellzählung auf Einzelzellniveau im Durchflußzytometer. Ein weiter Ansatz für den Verlust von Thrombozyten aus dem Ansatz ist die Anheftung der Thrombozyten auf der Fremdoberfläche selbst. Ein Verlust an Thrombozyten kann dementsprechend auch bei den Zellzahlen (siehe dort) nachvollzogen werden. Ein weiterer Ansatzpunkt für die gefallene MFI für CD41 auf Thrombozyten könnten morphologische Änderungen der Membranoberfläche infolge der Aktivierungsvorgänge sein. Der Oberflächenkontakt verändert möglicherweise die Membranrezeptoren so, dass es

die Thrombozyten physikalisch-chemischer Stimulation gegenüber widerstandsfähiger werden. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Oberflächenrezeptoren internalisiert werden.

4.2.5.2 Thrombozytenadhäsion an Leukozyten

Es konnte festgestellt werden, dass während der Rotation der Loops CD41-positive Thrombozyten an Leukozyten adhären. Deutlich wurde dies bei Lymphozyten die im Leerwert eine MFI von 11,67 für CD41, für den heparinbeschichteten Schlauch einen Anstieg der MFI auf 15,5 und beim PVC-Schlauch eine MFI von 17,58 zeigten. Die Vergleiche zeigten hohe Signifikanz der MW-Differenzen zwischen dem Leerwert und beiden Schlauchtypen, sowie zwischen den Schlauchtypen untereinander.

In der Granulozytenpopulation wurde ebenfalls ein Anstieg der Thrombozytenadhäsion durch steigende MFI angezeigt (Leerwert 1,28MFI, Heparin 1,358MFI, PVC 1,522MFI). Diese Unterschiede bestehen auf insgesamt niedrigem Fluoreszenzniveau und wurden im Student's T-Test bei allen Vergleichen signifikant gewertet (Leerwert-PVC, Leerwert-Heparin, PVC-Heparin), in der Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur jedoch nicht. Erfahrungsgemäß ist bei derart niedrigen Fluoreszenzsignalen eine kritische Beurteilung angemessen und die Ergebnisse sollten durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

4.2.5.3 Fibrinogenadhäsion an Leukozyten

4.2.5.3.1 Monoklonaler Fibrinogen-Antikörper

Es wurde die Anheftung von Fibrinogen an Granulozyten durch Detektion von sekundärmarkiertem Fibrinogen (PE) auf Granulozyten mit einem monoklonalen Antikörper untersucht. Bei einem Leerwert von 3,5MFI kam es nach 120min Rotation im Heparin-Loop zu einem Anstieg der MFI auf 4,96 und im PVC-Loop zu einem Anstieg der MFI von 7,02. Diese Anstiege belegten die Präsenz von Fibrinogen an Granulozyten, wobei ein Vergleich der MW-Unterschiede eindeutige Signifikanzen zwischen dem Leerwert und beiden Schlauchtypen, sowie unter den Schlauchtypen selbst ergaben ($p < 0,001$).

4.2.5.3.2 Polyklonaler Fibrinogen-Antikörper

Eine Wiederholung des vorangegangenen Versuchs mit einem polyklonalen Antikörper gegen Fibrinogen mit Sekundärmarkierung zeigte gegenüber dem Leerwert (5,29MFI) eine vermehrte Fibrinogenpräsenz an Monozyten nach 120min Rotation der Loop im heparinbeschichteten Schlauch (6,51MFI) und im PVC-Schlauch, dort jedoch geringer als im verglichenen Heparinschlauch (5,86MFI). Es bestand ein hohes Signifikanzniveau bei allen Standardvergleichen der Mittelwerte.

Das Verhalten der Fibrinogenadhäsion wurde bei Granulozyten deutlicher beobachtet. Hier wurden bei einem Leerwert von 6,0MFI eine Steigerung der MFI beim Heparinschlauch auf 8,4 und beim PVC-Schlauch auf 9,625 erfasst. Die ANOVA beurteilte die Anstiege der Fibrinogenadhäsion an Granulozyten als eindeutig signifikant mit $p < 0,001$ bei allen Vergleichen (Leerwert–Heparin/PVC, Heparin–PVC).

4.2.5.4 Fibrin-Adhäsion an Thrombozyten

Weiterhin wurde die Anheftung von Fibrin auf Thrombozyten mit einem sekundärmarkierten Fibrin-Antikörper detektiert. Hier konnten keine Unterschiede der Schlauche für Adhäsion von Fibrin an Thrombozyten nach 120min Rotation festgestellt werden (Leerwert 4,07MFI, Heparin 3,633MFI, PVC 4,8MFI). Auch eine ADP-Nachaktivierung eines Teils des Ausgangsbluts erbrachte keine gesteigerte Anheftung (4,477MFI). Um das Ergebnis zu kontrollieren wurde eine Positivkontrolle mit maximalem Aktivierungsreiz durch Zugabe von Glasperlen in einen Loop eingeführt, die mit einer Steigerung der MFI von 39,87 nach 120min gemessen wurde. Die Positivkontrolle war hierbei erwartet signifikant gegenüber allen anderen Messwerten ($p < 0,001$).

4.2.5.5 CD62P-Markierung auf Thrombozyten

Die Untersuchung des Merkmals P-Selektin (CD62P) auf Thrombozyten ergab eine Steigerung der Expression nach 120min Rotation der Schläuche gegenüber dem Leerwert. Es konnte ein schwacher Anstieg der MFI für CD62L des Leerwerts (5,17) auf den Heparinschlauch (6,68MFI), sowie ein stärkerer Anstieg zum unbeschichteten PVC-Schlauch (14,0 MFI) hin erfasst werden. Die

Mittelwertdifferenzen wurden bei allen Vergleichen als eindeutig signifikant in der ANOVA und im Student's T-Test bewertet ($p < 0,001$ für Leerwert-Heparin/Leerwert-PVC / Heparin-PVC).

4.2.5.6 Zusammenfassung der Thrombozytenstudien

Als Antwort auf Agonisten, wie dem Rotationsreiz, Thrombin, Kollagen oder ADP-Aktivierung, kann ein Spektrum spezifischer, aktivierungsabhängiger Veränderungen der Plättchenantigene detektiert werden. Die einwirkende Aktivierung führt zum Ablauf einer intrazellulären Kaskade von Signalübermittlungen, die unter anderem eine Änderung des Ionenflusses (Ca) und Alterationen des Zytoskeletts der Plättchen bewirken (Formänderung). Schließlich kommt es zur Sekretion von Endosomen, die eine Reorganisaion und Konformationsänderung der Oberflächenrezeptoren bewirken. Durch bidirektionale Kommunikation der Oberflächenglykoproteine, des mit der Oberfläche verbundene kanalikuläre System und intrazellulären Speichern, kommt es zu einer vermehrten Expression von GPIIb-GPIIIa-Komplexen und einer Abnahme der GPIIb-IX-Epitope. Die Konformationsänderungen der Oberflächenrezeptoren hat eine höhere Affinität für die entsprechenden Liganden zur Folge. Gleichzeitig kommt es zur Neo-Expression von Glykoproteinen aus α -Granula wie CD62P. Die Messung der Glykoprotein-Expression auf der Zelloberfläche lässt Rückschlüsse auf den Aktivierungsgrad und das Ausmaß der stattgefundenen Sekretionsvorgänge zu.

Nach Studien bewirkt eine um 5% gesteigerte CD62P-Expression eine vermehrte Anheftung von Plättchen an Leukozyten (Yeo,1993). Dies stimmt mit den gefundenen Messungen überein. Von anderen Untersuchern wurden während EKZ ein Fehlen von aktivierten Fibrinogen-Rezeptoren und P-Selektin-Expression berichtet (1) (21) (38). Nach den Messungen der vorliegenden Arbeit erscheint die damals aufgestellte Vermutung, die gesuchten Merkmale könnten nicht erfasst werden, da die aktivierten Plättchen während der Zirkulation vom Organismus abgebaut würden, nachvollziehbar. Die Adhäsion von Plättchen an Leukozyten wurde auch von Rinder et al. (63) im Zusammenhang mit dem Ausmaß der CD62P-Expression beschrieben. Hier kam es zu signifikanten Unterschieden. Die Aktivierung der Thrombozyten mit Formationsänderung der liganden-akzeptierenden Epitope führt zur vermehrten Adhäsion von Fibrinogen an die Zellen. Die Bindung von

Fibrinogen an die Fremdoberfläche (Festphase) stellt hierbei einen überaus starken Aktivierungsreiz auf Thrombozyten dar und führt zu Adhäsion, Aggregation und in fortgeschrittenem Maß unter Umständen zu thrombembolischen Prozessen.

Für beide getesteten Fremdoberflächen konnte auf Thrombozyten einwirkendes Aktivierungspotential nachgewiesen werden. Hierbei erwies sich die Heparinbeschichtung als schwächerer Reiz. Die Anheftung von Thrombozyten an Leukozyten, sowie die Expression von CD62P als Aktivierungsmarker könnten als sensitive Parameter der Hämokompatibilität von Fremdoberflächen dienen. Grund ist das Potential aktivierter Plättchen, über verschiedene Regelwege Thrombin zu generieren was zur Fibrinbildung und schließlich entweder zum Versagen des Biomaterials (Thrombusbildung) oder zu Nachteilen für den Patienten führen könnte. Weitere Studien werden über diesen Vorgang Aufschluss geben. Nicht zuletzt hat sich die Untersuchung von Adhäsionsvorgängen an Zellen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter mono-/polyklonaler Antikörper als technisch leicht durchführbar mit konstanten Ergebnissen erwiesen. Ein Verzicht auf eine Sekundärmarkierung mit Fluorochromen durch bereits konjugierte Antikörper wäre von Vorteil.

4.3.0 Lysemethoden

Die Lyse der Erythrozyten im Versuchsansatz stellt einen entscheidenden Schlüssel für eine qualitativ hochwertige Messung mit dem Durchflußzytometer dar. Da eine inkomplette Lyse den gesamten Messvorgang zunichte machen kann, legen alle Arbeitsgruppen mit durchflußzytometrischen Anwendungen besonderen Wert auf diesen Schritt und optimieren die Lyse nach Evaluation verschiedener Methoden nach eigenem Ermessen und Erfahrungen.

Die im Versuch getesteten Lyseverfahren wurden lediglich subjektiv ausgewertet, eine statistische Beurteilung fand nicht statt. Ausschlaggebend war die unkomplizierte Anwendung der Lysing-Reagents, eine klare optische Darstellung der Leukozytenpopulationen im Forward-/Sideward-Scatter, ein möglichst geringer Debris (Zellrümpfer der Lyse) – Anteil, sowie ein geringer Zellverlust aus dem Ansatz. Kritische Punkte für ein optimales Ergebnis lagen eindeutig in der Probenvor- und Aufbereitung, sowie in der optischen Justierung des Durchflußzytometers. Auch die Toleranz des Verfahrens gegenüber Anwenderfehlern erschien wichtig (überzogene Inkubationszeiten), wobei die Verfahren sich als relativ fehlertolerant

herausstellten und beispielsweise von vorne herein Inkubationszeiten von 15-120min zuließen.

Ein weiterer Aspekt war die Lagerung der Proben nach der Markierung mit Antikörpern bis zur Messung. Idealerweise sollten die Proben nach der Markierung zur Verhinderung weiterer Interaktionen auf Eis gelagert werden. Dies stellte jedoch während der Lyse ein Problem dar, da die Lyseverfahren teilweise kritisch auf Verfahren reagierten, die in gekühlter Umgebung durchgeführt wurden. Während die FACS-Lysing-Solution der Fa. Becton-Dickinson eine Inkubation auf Eis noch mit akzeptablen Störungen des späteren Messergebnisses zuließ, war dies bei den Lysereagenzien OptiLyse B und OptiLyse C (Fa.Coulter) nicht möglich. Ein Gating war nicht mehr nachvollziehbar und auch manuell nicht mehr durchzuführen. An diesem Unstand ändert auch eine nachgesetzte Reinigung der Ansätze durch Waschschrte nichts.

Unter Raumtemperaturbedingungen zeigte die FACS-Lysing-Solution das stabilste Ergebnis mit konstant 80%-90% eindeutig eingrenzbarer Zellen. Ähnliche Ergebnisse erzielte die Coulter OptiLyse B mit 77%-90% eindeutig abgrenzbarer Populationen, wobei dem eigentlich als No-Wash-Lyse angebotenen Verfahren zumindest ein Waschschritt nachgestellt werden musste um akzeptable Ergebnisse zu erhalten. Die Wahl der Lyse fiel aufgrund guter Erfahrungen auf die FACS-Lysing-Solution als Anwendung für alle Versuche. Als weitere Methode wurde eine Messung der fluoreszenzmarkierten Antikörper im Vollblut kurz erprobt, jedoch nicht fortgeführt, da Messungen im Vollblut ohne Lyse mit einer extrem hohen Zellzahl pro Messung einhergehen und die Einstellung des Geräts auf eine derart heterogene Suspension äußerst schwierig war. Durch ihre Größe überlagerten die Erythrozyten die optische Darstellung sehr stark.

Zellverluste entstanden hauptsächlich durch mehrere aufeinander folgende Waschschrte. Hierbei wurde die Erfahrung gemacht, dass sowohl die Verlängerung der Zentrifugationszeiten, sowie die sanfte Erhöhung der Endrotation einem Zellverlust vorbeugen können. Die vorsorgliche Erhöhung des Probenvolumens vor Beginn der Analyse mit entsprechender Korrektur der Zugabemengen von Antikörpern etc. trug ebenfalls zu konstanten Zellzahlen in der Messung bei. Letztendlich ließen sich die Ansätze bei ausreichendem Volumen leicht konzentrieren, bzw. korrigieren, wobei die durchflußzytometrische Messung nicht auf Volumen, sondern auf Einzelzellen in definierter Anzahl basierte.

Um das Nadelöhr der Lyse sicherer zu machen, war eine konstante Behandlung der Proben notwendig. Für das Durchflußzytometer Coulter EPICS XL existiert eine Erweiterungseinheit mit der Möglichkeit der vollautomatischen Lyse der Ansätze und anschließender Messung (Q-Prep®). Hierbei können sowohl Wash- als auch No-Wash Methoden zum Einsatz kommen. Eine Automatisierung der Lyse ist sicherlich von Vorteil, setzt jedoch die räumliche Nähe zwischen Markierung der Probe und Messplatz voraus.

Eine weitere Möglichkeit verbesserte Messbedingungen zu erzielen war die Herstellung von reinen Zielzell-Suspensionen, wie dies bei den Thrombozytenbestimmungen als PRP (Platelet-rich-plasma) und teilweise bei den intrazellulären Enzymen (Leukozytensuspension) angewandt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Zellen nach der Markierung mit Oberflächenantikörpern mittels Formalin-Lösung fixiert. Bei Enzymbestimmungen erfolgte dieser Schritt nach der Inkubation mit fluorochromkonjugierten Substraten. Das Formalin bewirkte hierbei den Tod der Zellen und somit den Stopp der Lebensvorgänge, was einerseits bei den Bestimmungen der intrazellulären Enzyme erwünscht war, andererseits aber die Integrität und natürliche Struktur der Zellen beeinflusste. In der Literatur wurde die Formalinfixierung zum Teil für den Verlust von Zellen aus den Ansätzen verantwortlich gemacht (75). Die Formalinfixierung wird kontrovers diskutiert. Der Aspekt der „Biosafety“ für den Anwender durch die Fixierung ist jedoch nicht zu unterschätzen und die Fixierung wurde nicht zuletzt aus diesem Grund in den Versuchen angewendet. Da die Spender nicht auf Infektionskrankheiten getestet wurden, ist die Messung von nicht-lebenden Zellen in diesem Fall von Vorteil.

4.4.0 Zellzahlen

Bei Betrachtung der Zellzahlen fielen für die Thrombozyten stärker abfallende Werte im unbeschichteten PVC-Schlauch (Leerwert PVC 263 Tsd/ μ l, PVC 60min 219 Tsd/ μ l, PVC120min 232 Tsd/ μ l) gegenüber der Heparinbeschichtung auf, in letzterem Schlauch blieben die Thrombozytenwerte näherungsweise konstant.

Die Erythrozytenzahlen blieben gegenüber den Leerwerten in beiden Schlauchtypen bei 60 und 120min Rotationsdauer im Rahmen der Messgenauigkeit annähernd

konstant .Die Leukozytenzahl fiel in beiden Schlauchtypen mit zunehmender Rotationsdauer in geringem Maß ab.

4.4.1 Zusammenfassung der Zellzahlen

Der Abfall der Thrombozyten und Leukozyten deckte sich mit den beobachteten Adhäsionsvorgängen zwischen den beiden Zelltypen. Aggregate aus Plättchen und weißen Blutkörperchen werden im Zell-Counter nicht mehr erfasst oder als Fehlmessung identifiziert. Weiterhin kommt es durch die bekannte, aber in dieser Arbeit nicht untersuchte, Adhäsion von Blutzellen an die Fremdoberfläche zu einem Zellverlust im Gesamtansatz.

Die Reduzierung beider Zellzahlen wurde bereits durch die Studien in anderen in-vitro Simulationsmodellen mit Vergleich beschichteter und unbeschichteter Schlauchsysteme untersucht. Bannan fand 1997 ebenfalls einen stärkeren Abfall der Thrombozyten in unbeschichteten gegenüber heparinbeschichteten Systemen mit Abhängigkeit von der Expositionsdauer (60min 26 vs. $193 \times 10^9/L$, $p < 0.01$, 120 min 28 vs. $193 \times 10^9/L$, $p < 0.01$). Diese Abfälle waren jedoch stärker als in der vorliegenden Arbeit, wie auch die von Bannan gemessenen Leukozytenzahlen (60min 0.9 vs. $2.4 \times 10^9/L$, $p < 0.01$, 120min 0.9 vs. $1.8 \times 10^9/L$, $p < 0.01$) (5) .

In vivo kommt es bei EKZ zu uneinheitlichen Schwankungen der Thrombozyten : Hatori et al. konnten zwischen beschichteten und unbeschichteten Systemen bei EKZ keine Unterschiede der Plättchenzahlen feststellen (23) , wohingegen Nakajima für die Heparinbeschichtung Duraflow einen signifikant schwächeren Abfall der Thr. gegenüber unbeschichtetem Material beschrieb ($p < 0,001$) (56) . Moen beschreibt ebenfalls diesen Vorteil der Duraflow-Beschichtung in-vivo mit signifikant geringerem Abfall der Thr. bei Heparinbeschichtung bereits in den ersten 10min nach EKZ-Einsatz. Hier erfuhr auch die Leukozytenzahl einen stärkeren Abfall bei Fehlen einer Beschichtung ($p < 0,04$) (52) .

Die unterschiedliche Reaktion der Thr./Leukozytenzahlen in-vivo und in-vitro können durch den Einsatz des Simulationsmodell als geschlossenes System ohne Möglichkeit der Rekrutierung weiterer Zellen aus dem Knochenmark oder Elimination/Migration aktivierter Zellen im Organismus in-vivo erklärt werden. Ein Vorteil der Heparinbeschichtung für die Biokompatibilität besteht sicherlich.

Die gleich bleibenden Erythrozytenzahlen weisen auf eine sehr geringe mechanische Schädigung der Zellen während des Versuchsablaufs hin, was positiv im Sinne der Hämokompatibilität gewertet wird.

4.5.0 Humorale Marker

4.5.1 β -Thromboglobulin

Bei fast gleichen Ausgangswerten (93 UI/ml) zeigte die β -Thromboglobulinmessungen einen schwachen Anstieg der Werte im heparinbeschichteten System bei 60min Rotation (339 UI/ml) mit weiter Wertezunahme bei Rotationsfortsetzung (120min 379 UI/ml). Die unbeschichtete Oberfläche rief eine weitaus stärkere Reaktion hervor mit einem starken 60min-Anstieg auf 1683 UI/ml und weitere Steigerung auf 2093 UI/ml nach 120min. Die Vergleiche der Mittelwerte im Student's T-Test ergaben alle eine hohe Signifikanz ($p < 0,001$).

Die gefundenen Anstiege werden durch andere Studien mit in-vivo Messungen der EKZ unterstützt. Derek et al. beschrieben für unbeschichtete Systeme β -TG-Anstiege von 81 ± 74 auf 288 ± 277 IU/ml im Vergleich zu heparinbeschichteten (Duraflow-II-)Systemen mit 104 ± 100 auf 284 ± 166 IU/ml, wobei die Unterschiede der Freisetzung mit $p < 0,001$ signifikant waren, aber erhebliche Patientenindividualität auswies (54). Den gleichen Sachverhalt beschrieb Nakajima 1996 ebenfalls bei einer Duraflow-II-Heparinbeschichtung im Vergleich mit unbeschichteten Systemen: Es kam zu weitaus weniger Plättchenaktivierung bei Präsenz einer Heparinbeschichtung im Gegensatz zur unbeschichteten Oberfläche (Heparin 237 ± 143 IU/ml, unbeschichtet 373 ± 131 IU/ml, $p < 0,05$). Messzeitpunkte waren hierbei der Beginn und das Ende der EKZ (56). Weitere Bestätigungen erfolgten durch Go et al und Pradhan et al (61). Dass diese Beobachtung keinesfalls einheitlich zu übertragen ist wurde stellte Hatori 1994 fest, der bei Untersuchung von heparinbeschichteten Oxygenatoren keine Unterschiede der β -TG-Freisetzung, bezogen auf die vorhandene / fehlende Beschichtung, erkennen konnte. Dennoch wurden sign. erhöhte Werte während der EKZ gegenüber dem Ausgangswert festgestellt (23). Vergleichbare Messungen in Simulationsmodellen wurden bisher selten vorgenommen. Die Mehrzahl der in-vivo beobachteten Änderungen der β -TG-Werte als Aktivierungsmarker für Thrombozyten bestätigt jedoch die Ergebnisse dieser Arbeit. Der größte Unterschied zu den vorgestellten Studien liegt hierbei in der Verwendung eines „geschlossenen Raumes“

für die Blutzellen während der Aktivierung. Es kann nicht zu den im Organismus auftretenden Abbauvorgängen der Plasmaproteine oder der aktivierten Thrombozyten kommen. Normalerweise wird β -TG in der Niere metabolisiert und erscheint daher bei Messungen während der EKZ nicht im gleichen Ausmaß im Ansatz als bei Bestimmung der Proben des Simulationsmodells. Die Beobachtung einer erniedrigten β -TG-Freisetzung wird als positiv im Sinne der Hämokompatibilität der Heparinbeschichtung bewertet.

4.5.2 PNM-Elastase

Von gleichem Ausgangsniveau aus (Hep. 31,5 μ g/l, PVC 30,5 μ g/l) fand eine schwächere Steigerung der PNM-Konzentration im Heparinschlauch statt (60min 46 μ g/l, 120min 61,9 μ g/l) als nach Kontakt mit unbeschichtetem Material (60min 59,6 μ g/l, 120min 140,8 μ g/l). Mittelwertunterschiede zwischen den Schlauchtypen werden im Student's T-Test zu beiden Abnahmezeitpunkten mit hoher Signifikanz ($p < 0,001$) bewertet.

Während der Rotation wurde offenbar Elastase aus den Granula der neutrophilen Granulozyten freigesetzt. Hierfür können mehrere Ursachen herangezogen werden, von denen eine direkte Aktivierung der Granulozyten durch den Kontakt mit der Fremdoberfläche im Vordergrund steht. Auch eine Aktivierung der intrinsischen Gerinnung mit Freisetzung der mediatorisch wirkenden Kontaktphasenproteine Faktor XII, Faktor XI, hochmolekulares Kininogen, sowie Präkallikrein und Einwirkung dieser auf die Granulozyten ist beschrieben und würde mit den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Kallikreinwerten übereinstimmen (12). Neutrophile besitzen jedoch auch die Fähigkeit in entstandene Mikrothromben zu migrieren und nach Kontakt mit Fibrin Elastase zu sekretieren (67). Die genaue Ursache der Elastaseerhöhung ist hier nicht zu bestimmen.

Das Untersuchungsergebnis wird in der Literatur von Bannan et al. bestätigt, bei deren in-vitro-Studien es bei ähnlichem Versuchsaufbau ebenfalls zu einem verminderten Anstieg der Elastase in einem heparinbeschichtetem Schlauchsystem kam (30min Aktivierung unbeschichtet 570 vs. heparinbeschichtet 145 μ g/l, $p < 0,01$, 60min Aktivierung 646 vs. 278 μ g/l, $p < 0,01$ und 120 min Aktivierung 613 vs. 403 μ g/l, $p < 0,05$).

Auch während realer EKZ wurden bei Einsatz eines heparinbeschichteten Systems niedrigere Werte für PNM-Elastase festgestellt als bei Verwendung unbeschichteter Oberflächen. Hatori bestimmt für die Beschichtung gegen fehlende Beschichtung bei 60min EKZ $558 \pm 521 \mu\text{g/l}$ vs. $988 \pm 769 \mu\text{g/l}$, und bei 90min EKZ 701 ± 488 vs. $1338 \pm 927 \mu\text{g/l}$ (23). Der gleiche Sachverhalt wurde von Kagisaki erfasst (Ausgangswerte Heparin-Gruppe $138 \pm 74 \text{pg/ml}$ / PVC-Gruppe $120 \pm 6 \text{pg/ml}$, während EKZ Heparin-Gruppe $370 \pm 168 \text{pg/ml}$ / PVC-Gruppe $1549 \pm 224 \text{pg/ml}$) (31) .

Es fiel auf, dass der Anstieg der PNM-Elastase sich mit dem Verhalten der durchflußzytometrisch gemessenen RGEs- und AAPV-Elastasen deckt. Dies wurde als Hinweis für eine alternative Verwendbarkeit beider methodischen Ansätze gewertet. Ein Vorteil der Heparinbeschichtung auf die Ausschüttung von Elastase durch verminderte Kontaktaktivierung scheint zu bestehen.

4.5.3 SC5b-9 – Komplement (TCC – Terminal Complement Complex)

Das Auftreten des terminalen SC5b-9-Komplement-Komplexes wurde bereits 1990 als relevanter Marker für die Evaluation der Biokompatibilität von Fremdoberflächen vorgeschlagen (14) . TCC bzw. SC5b-9 besitzt die Fähigkeit sowohl Zellmembranen zu attackieren und Plättchen zu aktivieren, als auch Endothelzellen zu aktivieren, die in der Folge Oberflächenrezeptoren generieren und Leukozyten binden. Mehrere klinische Studien konnten nachweisen, dass eine Heparinbeschichtung der Schlauchsysteme die Komplement- und Leukozytenaktivierung signifikant zu senken vermag. Bei Präsenz der Beschichtung zeigte sich dabei eine Reduktion der Komplementaktivierung über den „alternative pathway“ , was mit einer verminderten Anzahl zirkulierenden C3b/c und C5b-9 einhergeht. Diese Studien fanden auch, dass Patienten, die mit einem beschichteten System perfundiert worden waren, signifikant niedrigere Werte des terminalen Komplementkomplexes (TCC – C5b-9) aufwiesen und ein besseres klinisches Outcome hatten (29) (74) . Moen et al. fanden bei realer EKZ eine signifikant reduzierte Anzahl der terminalen Sc5b-9-Komplexe bei Verwendung von Heparinoberflächen. Bereits 10min nach EKZ-Start ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Fremdoberflächen mit deutlich reduzierten Mittelwerten im heparinbeschichteten Schlauch nachweisen ($p < 0,001$). Dieses Ergebnis wurde von Pekna et al. bestätigt, der ebenfalls eine Reduktion der TCC-Konzentration im Plasma unter Heparinbeschichtung vorfand (58) .

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einer verminderten TCC-Präsenz bei Beschichtung der Oberfläche in Kombination mit einer verminderten Up-Regulation der β 2-Integrine auf Leukozyten (CD11B), bzw. einer verminderten Down-Regulierung (CD18) ist ein Hinweis auf eine kausale Verbindung zwischen der terminalen Stecke der Komplementkaskade und der Leukozytenaktivierung. Ein Vorteil für die Hämokompatibilität durch die Heparinbeschichtung wird angenommen. Bei verschiedenen Ausgangswerten ließ sich in der vorliegenden Arbeit für die unbeschichtete Oberfläche eine initial weitaus stärkere Konzentration für Sc5b-9 nachweisen als für das heparinbeschichtete Material : Heparin Ausgangswert 190,2 ng Sc5b-9/l, 60min 578 ng Sc5b-9/l, 120min 883 ng Sc5b-9/l / PVC 26 ng Sc5b-9/l, 60min 1104 ng Sc5b-9/l, 1496 ng Sc5b-9/l . Die Unterschiede aller Abnahmezeitpunkte gegenüber den Kontrollen, sowie die Unterschiede zwischen beiden Schlauchtypen zeigten hohe Signifikanz ($p < 0,01$, 120min Hep. vs. 120min PVC $p = 0,01$).

4.5.4 Gerinnungsmarker

4.5.4.1 Thrombin-Antithrombin-Komplex

Die Aktivierung führte in beiden Schlauchtypen zum Anstieg der TAT-Mittelwerte. Dieser war im Heparinschlauch weniger stark ausgeprägt als im PVC-Schlauch, wobei in beiden Schläuchen der stärkste Anstieg in den ersten 60min der Rotation erfolgte und eine weitere, schwächere Steigerung zum 120min-Abnahmezeitpunkt registriert wurde. Heparin zeigte die Messwerte Leerwert 3,5 TAT $\mu\text{g/l}$, 60min 23 TAT $\mu\text{g/l}$, 120min 28,2 TAT $\mu\text{g/l}$, und PVC mit Leerwert 5,87 TAT $\mu\text{g/l}$, 60min 35,5 TAT $\mu\text{g/l}$, 120min 35,3 TAT $\mu\text{g/l}$. Gegenüber den Kontrollen zeigten alle abgenommenen Werte signifikante Unterschiede, nicht jedoch die direkten Vergleiche zwischen den Schläuchen zu den Zeitpunkten 60 und 120min.

Während im vorliegenden Versuch der verminderte Anstieg des TAT mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die bessere Hämokompatibilität durch die Carmeda-Beschichtung zurückzuführen ist, lässt sich dieser kausale Zusammenhang bei EKZ in-vivo nicht ohne weiteres herstellen, da mehrere von der EKZ unabhängige Faktoren zur Traumatisierung des Blutes beitragen (Absaugung, CellSaver, Re- und Transfusion etc.). Bei klinische Prüfung werden in Patienten, die mit heparinbeschichteten Systemen perfundiert werden entweder niedrigere oder auch

gleiche Werte für TAT im Vergleich zur Perfusion mit unbeschichteten Materialien gefunden. Eine der wenigen in-vitro Untersuchungen von Bannan et al zeigte einen Nachteil des unbeschichteten Systems gegenüber dem beschichtetem Material zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten aus einem closed-loop-Modell : 60min Rotation 24 vs. 13 mg/l, $p < 0.05$, 120 min Rotation 46 vs. 17 mg/l, $p < 0.05$ (5) . Diese Verhältnisse treffen auch in-vivo bei EKZ zu, jedoch können die Unterschiede zwischen den Schlauchtypen weniger deutlich ausfallen. Muehrcke et al. stellten nach 30min EKZ sowohl für beschichtete als auch unbeschichtete Systeme signifikante Anstiege von TAT fest ($p < 0,001$), jedoch keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Schlauchtypen. Erklärt wurde dieses Verhalten mit einer individuellen Antwort der Patienten auf die EKZ (54) .

Die Erhöhung der Zahl der TAT-Komplexe deutet auf einen gesteigerten Ablauf der Gerinnungskaskade mit vermehrter Bildung von Thrombin hin, da Antithrombin ausschließlich mit aktiviertem Thrombin bindet. Der Nachweis dieser Komplexe kann als Indikator der aktuellen Aktivierung dienen, da die Halbwertszeit der Komplexe mit 10min gering ist. Das Verhalten des Markers steht im Einklang mit den anderen erhobenen Parametern. Die Heparinbeschichtung scheint diesen Ablauf günstig zu beeinflussen. Die bessere Hämokompatibilität der Heparinbeschichtung wird in diesem Zusammenhang bestätigt.

4.5.4.2 Prothrombinfragment F1+2

Die Werte für Prothrombinfragment F1+2 stiegen in beiden Schläuchen mit zunehmender Rotationsdauer an. Der Anstieg fiel im heparinbeschichteten Schlauch vergleichsweise niedriger aus (Leerwert 0,59nmol/l, 60min 1,156 nmol/l, 120min 1,356nmol/l) als im unbeschichteten Schlauch (Leerwert 1,0nmol/l, 60min 3,1nmol/l, 120min 4,36nmol/l). Es bestand Signifikanz zwischen den Kontrollen/Leerwerten und allen Abnahmezeitpunkten ($p < 0,05$), sowie beim Mittelwertvergleich zwischen den 60min-Werten der Schlauchtypen.

Die Werte für Prothrombinfragment F1+2 ergänzen die Bestimmung von TAT, denn die Menge an F1+2 im Blut ist äquivalent zur Menge des entstandenen Thrombins. Der ELISA-Test erfasst somit die Faktor-Xa-Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin. Gemessen wurde die tatsächliche Menge an des in Thrombin umgewandelten Prothrombin. Anhand der Leerwertkontrolle konnte festgestellt

werden, dass es bereit vor der Rotation im ChandlerLoop zur Aktivierung der Gerinnung gekommen war, wenn auch in sehr geringem Umfang. Während des Rotationsvorgangs zeigten die heparinbeschichteten Schläuche eine geringere Thrombin-Generierung als unbeschichtete Systeme. Dies untermauert die Vermutung einer besseren Hämokompatibilität der Heparinbeschichtung. Danby et al. fanden 1997 in einem Simulationsmodell ebenfalls diesen Vorteil der Heparinbeschichtung (60min Aktivierung 0,7 vs. 13 nmol/l, $p < 0.01$, 120min Aktivierung 0,9 vs. 1,8 nmol/l, $p < 0.01$, 360 min Aktivierung 13,6 vs. 15nmol/l, $p < 0.05$) (5). F1+2 wird ebenfalls zur Bestimmung der lokalen Gerinnungsaktivität bei Applikation von Stents bei PTCA angewendet. Die Daten bestätigen einen Biokompatibilitätsvorteil der Heparinbeschichtung. Der Prothrombin F1+2-ELISA kann hierbei im Zusammenspiel mit dem Test auf Thrombin-Antithrombin-Komplexe als zuverlässiger Indikator für die Thrombogenität einer Oberfläche eingestuft werden. Es wurde beobachtet, dass sich beide Werte konsistent parallel entwickeln.

5.0.0 Zusammenfassung

Im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation werden während Operationen am offenen Herzen mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine (HLM) künstliche Kreisläufe geschaffen. Ziele sind sowohl die Bereitstellung eines optimalen Operationssitus für die Kardiochirurgie, als auch die Sicherstellung einer möglichst unbeeinträchtigten Kreislauffunktion für den Patienten. Die Hauptaufgaben des Herzens und der Lunge werden von der HLM ersetzt und temporär überbrückt. Für diesen Zweck muß das Blut des Patienten über den Ersatzkreislauf der Herz-Lungen-Maschine (extrakorporale Zirkulation, EKZ) geleitet werden, wobei es zu einem intensiven Kontakt zwischen dem Organ Blut und den eingesetzten künstlichen Fremdoberflächen kommt. In Abhängigkeit von der Thrombogenität der Fremdoberfläche können als Folge dieses Kontakts Aktivierungen von Kaskaden der Gerinnung und eine inflammatorische Antwort des Organismus auftreten.

Die Interaktionen zwischen Blut und Fremdoberfläche, sowie deren Folgen, werden in der Hämokompatibilitätsforschung untersucht. Die Schaffung einer optimal bio- und hämokompatiblen Oberfläche für die blutkontaktierenden Systeme ist Gegenstand der aktuellen Forschung auf diesem Gebiet. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse lassen sich auf einem breiten Einsatzgebiet in der Medizin anwenden - sowohl im extra- als auch intrakorporalen Bereich, etwa bei der Beschichtung von Stents für die perkutane transluminale Angioplastie (PTCA) oder der Herstellung von Gefäßprothesen und Kunstherzen. Die Hämokompatibilität einer Fremdoberfläche lässt sich prinzipiell durch Veränderung der Materialbeschaffenheit oder durch Aufbringen entsprechender Beschichtungen erhöhen. Beschichtungen mit Antikoagulantien unter Anwendung verschiedener Immobilisierungstechniken des gerinnungshemmenden Stoffes stehen derzeit im Mittelpunkt der Bemühungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hämokompatibilität von unbeschichtetem PVC und PVC mit einer Heparinbeschichtung (Carmeda ® Bioactive Surface) untersucht, wobei als Modell für den extrakorporalen Kreislauf der modifizierte Chandler-Loop zur Anwendung kam, der einen Blutfluß entlang den Fremdoberflächen unter kontrollierten Bedingungen simulieren kann.

Für das Verständnis der Interaktionen zwischen Blut und Fremdoberfläche hinsichtlich ihrer Entstehung (Pathway) und ihrer Kinetik, aber auch ihrer klinischen Auswirkungen auf den Organismus und möglichen schädigenden Wirkungen auf den Patienten, können in vivo- und in-vitro Untersuchungen herangezogen werden. Für die Untersuchungen der Hämokompatibilität wurden laborchemisch nachweisbare Aktivierungsmarker ausgewählt.

Neben der Anwendung von klassischen Bestimmungsmethoden für humorale Marker über ELISA-Techniken wurden in der vorliegenden Arbeit neue Techniken zur direkten Detektion von fluoreszenzmarkierten Antigenen etabliert. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie konnten Aktivierungsmarker sowohl auf den Oberflächen von Einzelzellen, als auch enzymologische Vorgänge innerhalb der Zellen erkannt und somit neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Die Heparinbeschichtung verminderte gegenüber unbeschichtetem PVC erfolgreich die Expression der Oberflächenantigene CD11B und CD11C auf Monozyten und Granulozyten, sowie die Abwärts-Regulation von CD18 und CD62L auf Granulozyten während der Aktivierungsphase im Chandler-Loop. Hieraus lässt sich eine geringere Aktivierung von CD11B-abhängigen Proteasen der Gerinnungskaskade ableiten. Gleichzeitig ist die verminderte Verlagerung der Antigene an die Zelloberfläche Ausdruck einer geringeren immunologischen Antwort auf die Aktivierung.

Die in der vorliegenden Arbeit angewendete neuere Methode der Flowenzymologie konnte wichtige Erkenntnisse über den Einfluß einer hämokompatiblen Beschichtung auf das intrazelluläre Enzymsystem beitragen. Es wurden durchweg stärkere Aktivierungen der Zellen bei Verwendung von unbeschichtetem Material im Simulationsmodell gemessen, als bei Präsenz der Heparinbeschichtung.

Eine besondere Stellung nimmt die Produktion von Superoxiden (Radikale / reaktive Sauerstoffverbindungen) während den Aktivierungs- bzw. Abwehrreaktionen der Zellen ein. Für den oxidativen Burst, einem komplexen zellulären Stoffwechselvorgang, der durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst werden kann, konnten die signifikantesten Unterschiede in der Granulozytenpopulation ($p=0,023$) zum Vorteil der Beschichtung aufgezeigt werden.

Sauerstoffverbindungen (Peroxide) wurden ebenfalls intrazellulär flowenzymologisch detektiert. Die Beschichtung wies einen protektiven Einfluß bei signifikant reduziertem Umsatz des Enzyms Peroxidase in allen Zellreihen ($p < 0,001$) beim Vergleich der beiden Materialien auf. Bei homogenen Ergebnissen innerhalb der Versuchsreihe wurde der Marker Peroxide als besonders aussagekräftig eingestuft. Das verminderte Auftreten dieser starken, intrazellulären Oxidantien wurde, bezogen auf die Hämokompatibilitätssteigerung der Heparinbeschichtung, als äußerst positiv gewertet.

Im bedeutsamen Kallikrein-Kinin-Regelsystem wurde ein deutlicher Anstieg des Kallikreins bei Lymphozyten ($p < 0,001$) und Granulozyten nach 120 Minuten Rotation im Loop ($p < 0,001$) bei unbeschichteten Oberflächen beobachtet. Für Monozyten und Granulozyten konnte die Aktivierung durch eine Inkubation der Proben über 5 Stunden nach Rotation weiter verstärkt werden, sodaß auch hier signifikante Unterschiede erreicht wurden. Da es sich bei Kallikrein um ein proteolytisches, pharmakologisch hochaktives Peptid mit einer Vielzahl von Wirkungen handelt, rückte es in der Methodenevaluation der vorliegenden Arbeit ins Zentrum des Interesses.

Es liegt der Schluß nahe, dass die Oberflächenbeschichtung mit Heparin die Wirkung des Kallikrein und des Faktor XII auf die intrinsische Gerinnung, die Fibrinolyse und das Komplement reduzieren kann. Bei der flowenzymologischen Untersuchung der intrazellulären Elastaseaktivität wurden ähnliche Messergebnisse wie bei den ebenfalls durchgeführten konventionellen (ELISA-) Messungen gefunden. Die Vorteile der Heparinbeschichtung wurden bei Messung der AAPV- und RGEs-Elastasen bestätigt, die in allen Zelllinien geringere Expression fanden, was auf hohem Signifikanzniveau ($p < 0,001$) validiert werden konnte. Die Elastasen fanden Eingang als gut reproduzierbarer Parameter für die Hämokompatibilität.

Als weitere Signalträger der intra- und interzellulären Kommunikation wurde besonderes Augenmerk auf die Interleukine gelegt. Bei drei untersuchten Interleukinen konnte für Interleukin-1 β eine Zunahme der Messwerte bei Einfluß der unbeschichteten PVC-Oberfläche gegenüber der Beschichtung in der Granulozytenpopulation verzeichnet werden ($p < 0,01$). Ebenso verhielt sich der Tumor-Nekrose-Faktor- α in der gleichen Zellreihe. In Lymphozyten und Monozyten

wurden Messwertänderungen ohne deutliche Tendenz registriert. Ein möglicher Grund für die schwächeren Messergebnisse im Simulationsmodell kann in der de-novo-Synthese der Interleukine während der Aktivierung liegen, was zu einem verzögerten Anstieg führt. Messungen in-vivo zeigten nach Einsatz einer EKZ für mehrere Stunden deutlichere Anstiege. Die weitreichenden Funktionen der Zytokine für die Hämokompatibilität bedürfen weiterer Klärung, es sind jedoch Schlüsselfunktionen für die Abläufe während der Aktivierung nach Kontakten mit Fremdoberflächen zu vermuten und weiter zu untersuchen.

Das HeatShockProtein HSP70 ist Teil einer Gemeinschaft verschiedener Eiweiße, die sich nach Einwirkung von verschiedensten Stressformen auf die Zelle, incl. des Hitze-Stresses, bisher ubiquitär im menschlichen Organismus nachweisen ließen. Auch hierbei handelte es sich um eine intrazelluläre Bestimmung. Für das HSP 70 konnte keine Aussage über die Eignung als Marker für die Hämokompatibilität getroffen werden. Zwar wurde die korrekte Etablierung der Testmethode bestätigt, die Unterschiede auf niedrigem Fluoreszenzniveau wurden jedoch nicht als aussagekräftig gewertet. Hier sollten methodische Kontrollen über andere Verfahren (PCR) folgen. Die Nachweisgrenze des Markers, auch im Hinblick auf die erforderliche Sekundärmarkierung mit Fluorochromen, scheint für der Durchflußzytometrie zu gering zu sein.

Als Boostereffekt für die intrazellulären Bestimmungen konnte die fünfständige Nachaktivierung durch Inkubation erfolgreich etabliert werden. Dieser methodische Ansatz entspricht gleichzeitig am nächsten der physiologischen Umgebung und könnte in weiteren Untersuchungen mit in-vivo gewonnen Messwerten von Patienten während realer EKZ verglichen werden.

Die Vorteile der Direktmarkierung von Zellen in der Durchflußzytometrie wurden in den Thrombozytenstudien weiter deutlich, und konnten Erkenntnisse über das Adhäsionsverhalten der an der Gerinnung beteiligten Zellen aufzeigen.

Änderungen der Thrombozytenfunktionen nehmen in der Gerinnungsforschung eine herausragende Stellung ein, da die nachgewiesenen Konformationsänderungen der Oberflächenglykoproteine eine Veränderung der Affinität für gerinnungsaktive Liganden bedeuten. Ein Vorteil des angewendeten Simulationsmodells für die

Thrombozytenstudien besteht darin, dass aktivierte Plättchen in-vivo vom Organismus abgebaut werden und im Simulationsmodell erstmals optimierte Untersuchungsbedingungen entstehen. Festgestellte abnehmende Zellzahlen der Thrombozyten lassen Rückschlüsse auf interzelluläre Adhäsionen und Bindung der Zellen an die Fremdoberfläche zu.

Eine zunehmende Adhäsion von Fibrinogen an Monozyten und Granulozyten bei Verwendung von unbeschichtetem PVC-Material wurde nachgewiesen. Auch eine vermehrte Expression des Aktivierungsmarkers P-Selektin (CD62P) auf der Thrombozytenoberfläche in PVC-Schläuchen verdeutlichte die verminderte Hämokompatibilität des Materials.

Die Erkenntnisse der durchflußzytometrischen Untersuchungen hinsichtlich der Hämokompatibilität wurden von einer Reihe löslicher Aktivierungsmarker ergänzt:

Der humorale Marker β -Thromboglobulin, ein bei der Thrombozytenaggregation aus α -Granula freigesetzter Thrombozytenfaktor, zeigte signifikante Unterschiede zwischen beschichtetem und unbeschichtetem PVC-Material ($p < 0,001$).

Ein deutlicher Unterschied wurde auch im konventionellen ELISA für die PMN-Elastase festgehalten und durch die Messung des terminalen Komplement-Komplexes sC5b9 untermauert. Alle drei Marker wurden als relevant für Hämokompatibilitätsuntersuchungen bestätigt und haben hohen Stellenwert bei der Evaluation von Fremdoberflächen erreicht.

Die Beobachtung einer verminderten Präsenz des Terminalen-Komplement-Komplexes (TCC) bei Beschichtung der Oberfläche in Kombination mit einer verminderten Up-Regulation der $\beta 2$ -Integrine auf Leukozyten (CD11B), bzw. einer verminderten Down-Regulierung (CD18) wies auf eine kausale Verbindung zwischen der terminalen Strecke der Komplementkaskade und der Leukozytenaktivierung hin.

Im Rückblick auf die durchflußzytometrischen Thrombozytenstudien wurde das Verständnis des Gerinnungswegs durch Bestimmung der humoralen Gerinnungsmarker Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) und des Prothrombin-Fragment F1+2, jeweils als konventionelle ELISA's, ergänzt. Hier zeigten die humoralen Marker ebenfalls signifikante Vorteile einer Beschichtung der Fremdoberfläche mit Heparin auf.

Weiter wurden grundlegende Arbeitsgänge der Durchflußzytometrie, wie die Lyse der Erythrozyten in den Probenansätzen, die Separation der Zell-Populationen aus dem Vollblut, etabliert und erfolgreich optimiert. Diese Vorarbeiten ließen eine hohe Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit bei den Analysevorgängen zu.

Es lässt sich festhalten, dass die Anwendung zweier unterschiedlicher Labormethoden - Durchflußzytometrie und konventionelle ELISA's - in der Hämkompatibilitätsforschung sowohl für eine Kontrollfunktion der Methoden gegeneinander, als auch für die Förderung des Verständnisses zum Ablauf des Pathways der Gerinnung und anderer Reaktionskaskaden, von Vorteil sind. Marker zukünftiger Untersuchungen im molekularen, bzw. genetischen Bereich (PCR) werden neuere Erkenntnisse beitragen.

Hervorzuheben ist der fundamentale Unterschied der Messungen zwischen lebenden und toten Zellen. Insbesondere die Detektion der „vitalen“ intrazellulären Marker, vor allem in der Flowenzymologie, ist vielversprechend und wird in Zukunft weiter die Zusammenhänge der beteiligten Aktivierungssysteme nach Fremdoberflächenkontakt verdeutlichen können. In nachfolgenden Studien sollten die untersuchten Marker auf eine engere Kinetik hin geprüft werden.

Der momentane Stand der bei der Schaffung einer idealen hämkompatiblen Oberfläche wird durch moderne laborchemische Methoden kritisch untersucht. Der erzielte Fortschritt der Bemühungen kann durch diese Bestimmungen validiert oder verworfen werden. Die vorliegende Arbeit konnte zum einen einen Ausschnitt der anwendbaren Methoden demonstrieren, zum anderen auch die Möglichkeiten sinnvoller Methodenkombination für nachfolgende Studien aufzeigen.

Fernziel der Forschungsbemühungen um die Hämkompatibilität bleibt die Bereitstellung einer Oberfläche, die auf die gegenwärtige Umgebung reagiert. Dies könnte durch Freisetzung von antikoagulatorischen oder antiinflammatorischen Substanzen geschehen (intelligenter Werkstoff / intelligente Beschichtung). Der Weg dorthin wird von einer Vielzahl von Untersuchungen auf laborchemischer Ebene begleitet werden, die neue Erkenntnisse über die real erzeugte Kompatibilität und

eine Erweiterung des Kenntnisstandes über die Reaktionsmuster zwischen Blut und Fremdoberfläche beitragen werden.

6 Abstract

Gegenstand Der Einsatz der extrakorporalen Zirkulation (EKZ, Herz-Lungen-Maschine) ruft über den Kontakt von Blut mit Fremdoberflächen des artifiziiellen Kreislaufs (Schlauchsysteme, Oxygenatoren) Reaktionen auf zellulärer Ebene des Blutes hervor. Die Aktivierungen schließen Abwehr-, Gerinnungs- und Signalübertragungssysteme ein und erstrecken sich weiter auf den Zellstoffwechsel. Um diese Nebeneffekte zu minimieren, wurden Maßnahmen zur Steigerung der Hämokompatibilität der Systeme ergriffen. Sie umfassen u.a. eine Optimierung der Werkstoffzusammensetzung, sowie Techniken der Beschichtung von Fremdoberflächen mit antikoagulatorischen Substanzen.

Methoden Die vorliegende Arbeit verglich die hämokompatiblen Eigenschaften einer PVC-Oberfläche mit einer heparinbeschichteten PVC-Oberfläche. Es kam ein Modell zum Einsatz, das den Blutfluß entlang einer zu testenden Oberfläche simuliert (ChandlerLoop). Hämokompatibilitätsparameter wurden über ELISA-Techniken, sowie über neu etablierte, durchflußzytometrische Methoden, einschließlich der Flowenzymologie bestimmt. Ziel war neben der Hämokompatibilitätsuntersuchung der Oberflächen, die Etablierung und Evaluation von durchflußzytometrischen Labormethoden. Für die Durchflußzytometrie umfassten die Aktivierungsmarker CD11B/C und CD18/62L, sowie flowenzymologisch intrazellulär die Bestimmung von Kallikrein, Oxidativem Burst, Peroxiden und RGEs- / AAPV-Elastasen. Weiterhin wurden Interleukine (IL1 β , IL2, TNF- α), das Hitzeschockprotein HSP70, sowie Studien zur Adhäsion von Thrombozyten, Fibrin, Fibrinogen und Leukozyten durchgeführt. Dieser Teil der Analyse wurde von den konventionellen Hämokompatibilitätsmarkern PMN-Elastase, Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT), β -Thromboglobulin, F1+2 Prothrombin, SC5b9-Komplement sowie einer Zellzahlzählung ergänzt.

Ergebnisse Die Heparinbeschichtung verminderte gegenüber unbeschichtetem PVC erfolgreich die Expression von CD11B und CD11C auf Monozyten und Granulozyten, sowie die Abwärts-Regulation von CD18 und CD62. Bei den flowenzymologischen Untersuchungen wurden durchweg stärkere Aktivierungen der Zellen bei Verwendung von unbeschichtetem Material im Simulationsmodell gemessen. Dies betraf in Granulozyten Kallikrein, oxidativen Burst, Peroxiden und AAPV-/RGEs-Elastase. Bei den Interleukinen wurden signifikante Anstiege für IL1 β und TNF- α detektiert. Die zunehmende Adhäsion von Fibrinogen an Monozyten und Granulozyten bei Verwendung von unbeschichtetem PVC-Material wurde nachgewiesen, ebenso die vermehrte Präsenz des P-Selektin (CD62L) auf Thrombotzyten. Alle konventionellen humoralen Marker erreichten im Vergleich Signifikanzniveau und zeigen die Überlegenheit des heparinbeschichteten Materials.

Bewertung Die Vorteile des heparinbeschichteten Systems gegenüber der unbeschichteten Oberfläche für die Hämokompatibilität konnten anhand einer Reihe der ausgewählten Aktivierungsmarker validiert werden. Die erfolgreiche Etablierung der durchflußzytometrischen Methoden und der konventionellen Bestimmungen über ELISA's erlaubte eine sichere Reproduzierbarkeit. Die vielversprechenden flowenzymologischen Untersuchungen geben Anlass zur weiteren Evaluation auf diesem methodischen Gebiet – gleichzeitig wurden die konventionellen Messungen als reliable Kontrollfunktion für andere Methoden erkannt. Durch einen immer grösser werdenden Pool an verfügbaren laborchemischen Methoden werden die Untersuchungsmöglichkeiten für die Hämokompatibilität von Fremdoberflächen in Zukunft weit mehr Ansatzpunkte haben und weitere Erkenntnisse zum Ablauf der Aktivierungs- und Gerinnungspaths beitragen, sowie die Herstellung einer, vom menschlichen Organismus, optimal verträglichen Fremdoberfläche unterstützen.

7 Literaturverzeichnis

1. Abrams, C. Direct Detection of Activated Platelets and Platelet-Derived Microparticles in Humans. *Blood* 75, 128-138. 1990.
2. Adrian, K., Mellgren, K., Skogby, M., Friberg, L. G., Mellgren, G., and Wadenvik, H. Cytokine Release During Long-Term Extracorporeal Circulation in an Experimental Model. *Artif.Organs* 1998;22(10):859-63.
3. Alberts, B; Bray, D; Lewis, J. *Molecular Biology of the Cell. Molecular Biology of the Cell.* 2 ed.Garland Publishing Inc. New York; 1989. pp.704-5.
4. Ascione, R., Lloyd, C. T., Underwood, M. J., Lotto, A. A., Pitsis, A. A., and Angelini, G. D. Inflammatory Response After Coronary Revascularization With or Without Cardiopulmonary Bypass. *Ann.Thorac.Surg.* 2000;69(4):1198-204.
5. Bannan-S, Danby-, Cowan-, Ashraf-, Gesinde-, and Martin-P. Cell Activation and Thrombin Generation in Heparin Bonded Cardiopulmonary Bypass Circuits Using a Novel in Vitro Model. *Eur-J-Cardiothorac-Surg.* 1997;12:268-75LHM: Diese Zeitsc.
6. Bass, DA, Parce, JW, and Dechatelet, LR. Flow Cytometric Studies of Oxidative Product Formation by Neutrophils : a Graded Response to Membrane Stimulation. *Immunology* 1983;130:1910-7.
7. Baufreton, C., Jansen, P. G., Le Besnerais, P., te, Velthuis H., Thijs, C. M., Wildevuur, C. R., and Loisanche, D. Y. Heparin Coating With Aprotinin Reduces Blood Activation During Coronary Artery Operations. *Ann.Thorac.Surg.* 1997;63(1):50-6.
8. Baufreton, C., Velthuis, H. T., Jansen, P. G., Besnerais, P. L., Wildevuur, C. H., and Loisanche, D. Y. Reduction of Blood Activation in Patients Receiving Aprotinin During Cardiopulmonary Bypass for Coronary Artery Surgery. *ASAIO J.* 1996;42(5):M417-M423.
9. Bode, W, Meyer, E, and Power, JC. Human Leukocyte and Porcine Pancreatic Elastase : X-Ray Crystal Structures, Mechanism, Substrate Specificity and Mechanism-Based Inhibitors. *Biochem.J.* 1989;28:1951-63.
10. Cavarocchi, N. C., England, M. D., Schaff, H. V., Russo, P., Orszulak, T. A., Schnell, W. A., Jr., O'Brien, J. F., and Pluth, J. R. Oxygen Free Radical Generation During Cardiopulmonary Bypass: Correlation With Complement Activation. *Circulation* 1986;74(5 Pt 2):III130-III133.
11. Chandler, AB. In Vitro Thrombotic Coagulation of the Blood, a Method for Producing a Thrombus. *Lab-Invest.* 1958;7:110-4.
12. Colman, R. W. Platelet and Neutrophil Activation in Cardiopulmonary Bypass. *Ann.Thorac.Surg.* 1990;49(1):32-4.
13. Defraigne, J. O., Pincemail, J., Larbuisson, R., Blaffart, F., and Limet, R. Cytokine Release and Neutrophil Activation Are Not Prevented by

Heparin- Coated Circuits and Aprotinin Administration.
Ann.Thorac.Surg. 2000;69(4):1084-91.

14. Deppisch, R., Schmitt, V., Bommer, J., Hansch, G. M., Ritz, E., and Rauterberg, E. W. Fluid Phase Generation of Terminal Complement Complex As a Novel Index of Bioincompatibility. *Kidney Int.* 1990;37(2):696-706.
15. Dreyer, W. J., Smith, C. W., and Entman, M. L. Invited Letter Concerning: Neutrophil Activation During Cardiopulmonary Bypass. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1991;102(2):318-20.
16. Dutton, R. C., Edmunds, L. H., Jr., Hutchinson, J. C., and Roe, B. B. Platelet Aggregate Emboli Produced in Patients During Cardiopulmonary Bypass With Membrane and Bubble Oxygenators and Blood Filters. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1974;67(2):258-65.
17. Engelberg-H. Studies With the Chandler Rotating Loop. Evidence That Thrombin Generation Is Responsible for the Formation of the Artificial in Vitro Thrombi. *.Thromb-Diath-Haemorrh.* 1969;22:344-50.
18. Finn, A., Rebuck, N., and Moat, N. Neutrophil Activation During Cardiopulmonary Bypass. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1992;104(6):1746-8.
19. Gardner-RA. An Examination of the Fluid Mechanics and Thrombus Formation Time Parameters in a Chandler Rotating Loop System. *.J-Lab-Clin-Med.* 1974;84:494-508.
20. Gartner, TK and Power, JW. The Tetr peptide Analogue of the Alpha Chain and Decapeptide Analogue of the Gamma Chain of Fibrinogen Bind to Different Sites on the Platelet. *Blood* 1985;66(Suppl.1):305a.
21. George, J. N., Pickett, E. B., Saucerman, S., McEver, R. P., Kunicki, T. J., Kieffer, N., and Newman, P. J. Platelet Surface Glycoproteins. Studies on Resting and Activated Platelets and Platelet Membrane Microparticles in Normal Subjects, and Observations in Patients During Adult Respiratory Distress Syndrome and Cardiac Surgery. *J.Clin.Invest* 1986;78(2):340-8.
22. Haeflner-Cavaillon, N. and Kazatchkine, M. D. [Induction of Interleukin-1 Synthesis. A New Criterion of Biocompatibility of Extracorporeal Circuits]. *Presse Med.* 4-5-1991;20(17):797-801.
23. Hatori-N, Yoshizu-, Haga-, Kusama-, Takeshima-, Segawa-, and Tanaka-S. Biocompatibility of Heparin-Coated Membrane Oxygenator During Cardiopulmonary Bypass. *.Artif-Organs.* 1994;18:904-10LHM: Zeitschr in.
24. Hioki, I., Yada, I., Nishikawa, M., Shomura, Y., Cruz, B. P., Onoda, K., Tani, K., Shimono, T., and Shinpo, H. Comparative Studies of Glycoprotein Ib in Heparin Coated and Nonheparin Coated Extracorporeal Circulation Circuits. *ASAIO J.* 1998;44(5):M397-M400.

25. Hogevoid, H. E., Lyberg, T., Kahler, H., and Reikeras, O. Expression of Beta-2-Integrins and L-Selectin by Leukocytes and Changes in Acute-Phase Reactants in Total Hip Replacement Surgery. *Eur.Surg.Res.* 1996;28(3):190-200.
26. Hogevoid, HE; Moen, O. Effect of heparin coating on the expression of CD11B,CD11C and CD62L by lycopocytes in extracorporeal circulation in vitro. *Perfusion* 12:9-20. 1997.
27. Hsu-LC. Issues of Biocompatibility: Heparin-Coated Extracorporeal Circuit. *Int-Anesthesiol-Clin.* 1996;34:109-22LHM: Zeitschr in.
28. Hulett, HR and Bonner, WA. Cell Sorting : The Automated Separation of Mammilian Cells As a Function of Intracellular Fluorescence. *Scienc* 1969;166:747-57.
29. Jansen, P. G., te, Velthuis H., Huybregts, R. A., Paulus, R., Bulder, E. R., van der Spoel, H. I., Bezemer, P. D., Slaats, E. H., Eijnsman, L., and Wildevuur, C. R. Reduced Complement Activation and Improved Postoperative Performance After Cardiopulmonary Bypass With Heparin-Coated Circuits. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1995;110(3):829-34.
30. Jutila, M. A., Rott, L., Berg, E. L., and Butcher, E. C. Function and Regulation of the Neutrophil MEL-14 Antigen in Vivo: Comparison With LFA-1 and MAC-1. *J.Immunol.* 15-11-1989;143(10):3318-24.
31. Kagisaki-K, Masai-, Kadoba-, Sawa-, Nomura-, Fukushima-, Ichikawa-, Ohata-, Suzuki-, Taketani-, and Matsuda-H. Biocompatibility of Heparin-Coated Circuits in Pediatric Cardiopulmonary Bypass. *Artif-Organs.* 1997;21:836-40LHM: Zeitschr in.
32. Kamler, M., Chatterjee, T., Stemberger, A., Gebhard, M. M., Hagl, S., and Jakob, H. Hirudin Protects From Leukocyte/Endothelial Cell Interaction Induced by Extracorporeal Circulation. *Thorac.Cardiovasc.Surg.* 2001;49(3):157-61.
33. Kaplan, S. S., Basford, R. E., Kormos, R. L., Hardesty, R. L., Simmons, R. L., Mora, E. M., Cardona, M., and Griffith, B. L. Biomaterial Associated Impairment of Local Neutrophil Function. *ASAIO Trans.* 1990;36(3):M172-M175.
34. Kaplan, S. S., Basford, R. E., Mora, E., Jeong, M. H., and Simmons, R. L. Biomaterial-Induced Alterations of Neutrophil Superoxide Production. *J.Biomed.Mater.Res.* 1992;26(8):1039-51.
35. Kaplow, LS and Dauber, H. Assessments of Monocyte Esterase Activity by Flow Cytophotometry. *J.Histochem.Cytochem.* 1976;24:363-6.
36. Karlsson-C, Nygren-, and Braide-M. Exposure of Blood to Biomaterial Surfaces Liberates Substances That Activate Polymorphonuclear Granulocytes. *J-Lab-Clin-Med.* 1996;128:496-505LHM: Diese Zeits.

37. Kawahito, K., Kobayashi, E., Ohmori, M., Harada, K., Kitoh, Y., Fujimura, A., and Fuse, K. Enhanced Responsiveness of Circulatory Neutrophils After Cardiopulmonary Bypass: Increased Aggregability and Superoxide Producing Capacity. *Artif.Organs* 2000;24(1):37-42.
38. Kondo, C., Tanaka, K., Takagi, K., Shimono, T., Shinpo, H., Yada, I., Yuasa, H., Kusagawa, M., Akamatsu, N., and Tanoue, K. Platelet Dysfunction During Cardiopulmonary Bypass Surgery. With Special Reference to Platelet Membrane Glycoproteins. *ASAIO J.* 1993;39(3):M550-M553.
39. Kozek-Langenecker, S. A. Anticoagulation With Prostaglandins During Extracorporeal Circulation. *Wien.Klin.Wochenschr.* 26-2-1999;111(4):129-40.
40. Ladowski, J. S., Schatzlein, M. H., Peterson, A. C., Deschner, W. P., Matheis, R., Ellenwood, M., Bach, J., Moldovan, L., and McKamey, D. Clinical Heparin Coated Cardiopulmonary Bypass: Reduction of Systemic Heparin Requirements for Redo Cardiac Surgery. *ASAIO J.* 1996;42(1):34-6.
41. Larm, O., Larsson, R., and Olsson, P. A New Non-Thrombogenic Surface Prepared by Selective Covalent Binding of Heparin Via a Modified Reducing Terminal Residue. *Biomater.Med.Devices Artif.Organs* 1983;11(2-3):161-73.
42. Le-Deist-F, Menasche-, Bel-, Lariviere-, Piwnica-, and Bloch-G. Patterns of Changes in Neutrophil Adhesion Molecules During Normothermic Cardiopulmonary Bypass. A Clinical Study. *.Eur-J-Cardiothorac-Surg.* 1996;10:279-83LHM: Diese Zeitsc.
43. Ljungberg-J and Hedner-U. Potentiated Thrombolysis in a Chandler System Using RtPA and Lys- Plasminogen. *.Thromb-Res.* 1989;53:569-76LHM: Diese Zeitsc.
44. Ljunghusen, O., Cederholm, I., Lundahl, J., Nilsson, B., Olin, C., Sjogren, F., and Stendahl, O. Phenotypic Alterations in Circulating Monocytes Induced by Open Heart Surgery Using Heparinized and Nonheparinized Cardiopulmonary Bypass Systems. *Artif.Organs* 1997;21(10):1091-7.
45. Macey, M. G., McCarthy, D. A., Trivedi, U. R., Venn, G. E., Chambers, D. J., and Brown, K. A. Neutrophil Adhesion Molecule Expression During Cardiopulmonary Bypass: a Comparative Study of Roller and Centrifugal Pumps. *Perfusion* 1997;12(5):293-301.
46. Marti, F., Munoz, J., Peiro, M., Bertran, E., Ferran, C., Octavio, C., Garcia, J., and Rueda, F. Higher Cytotoxic Activity and Increased Levels of IL-1 Beta, IL-6, and TNF-Alpha in Patients Undergoing Cardiopulmonary Bypass. *Am.J.Hematol.* 1995;49(3):237-9.
47. Mathew-JP, Rinder-C, Tracey-J, Auszura-L, O'Connor-T, Davis-, and Smith-BR. Acadesine Inhibits Neutrophil CD11b Up-Regulation in Vitro and During in Vivo Cardiopulmonary Bypass. *.J-Thorac-Cardiovasc-Surg.* 1995;109:448-56LHM: Diese Zeitsc.

48. McDonald, JA and Kelley, DG. Degradation of Fibronectin by Human Leukocyte Elastase. *J.Biol.Chem.* 1980;255:8848-58.
49. Mirow, N., Brinkmann, T., Minami, K., Tenderich, G., Schulte-Eistrup, S., Kleesiek, K., and Korfer, R. Low Dose Systemic Heparinization Combined With Heparin-Coated Extracorporeal Circulation. Effects Related to Platelets. *J.Cardiovasc.Surg.(Torino)* 2001;42(5):579-85.
50. Mishell, B and Shiigi, A., *Selected Methods in Cellular Immunology*WH Freeman & Company; 1980.
51. Miyauchi, Y. and Isomura, K. Quantitative and Functional Changes in Platelets and Their Preservation During Extracorporeal Circulation. *J.Cardiovasc.Surg.(Torino)* 1982;23(5):383-90.
52. Moen-O, Hogasen-, Fosse-, Dregelid-, Brockmeier-, Venge-, Harboe-, and Mollnes-TE. Attenuation of Changes in Leukocyte Surface Markers and Complement Activation With Heparin-Coated Cardiopulmonary Bypass. *.Ann-Thorac-Surg.* 1997;63:105-11LHM: Diese Zeitsc.
53. Moore, M. A., Kaplan, D. S., Picciolo, G. L., Wallis, R. R., and Kowolik, M. J. Effect of Cellulose Acetate Materials on the Oxidative Burst of Human Neutrophils. *J.Biomed.Mater.Res.* 5-6-2001;55(3):257-65.
54. Muehrcke-DD, McCarthy-P, Kottke-Marchant-, Harasaki-, Pierre-Yared-, Borsh-J, Ogella-D, and Cosgrove-DM. Biocompatibility of Heparin-Coated Extracorporeal Bypass Circuits: a Randomized, Masked Clinical Trial. *.J-Thorac-Cardiovasc-Surg.* 1996;112:472-83LHM: Diese Zeitsc.
55. Mumby, S., Block, R., Petros, A. J., and Gutteridge, J. M. Hydrogen Peroxide and Catalase Are Inversely Related in Adult Patients Undergoing Cardiopulmonary Bypass: Implications for Antioxidant Protection. *Redox.Rep.* 1999;4(1-2):49-52.
56. Nakajima-T, Osawa-, Ogawa-, Sasaki-, Izumoto-, Yagi-, and Kawazoe-K. Clinical Study of Platelet Function and Coagulation/Fibrinolysis With Duraflon II Heparin Coated Cardiopulmonary Bypass Equipment. *.Asaio-J.* 1996;42:301-5LHM: Zeitschr in T.
57. Nygren, H., Braide, M., and Karlsson, C. Different Kinetics of the Respiratory Burst Response in Granulocytes, Induced by Serum From Blood Coagulated in Contact With Polymer Materials. *Biomaterials* 2000;21(2):173-82.
58. Pekna-M, Hagman-, Halden-, Nilsson-U, Nilsson-, and Thelin-S. Complement Activation During Cardiopulmonary Bypass: Effects of Immobilized Heparin [See Comments]. *.Ann-Thorac-Surg.* 1994;58:421-4LHM: Diese Zeitsch.
59. Peters-MJ, Heyderman-R, Hatch-D, and Klein-NJ. Investigation of Platelet-Neutrophil Interactions in Whole Blood by Flow Cytometry. *.J-Immunol-Methods.* 1997;209:125-35LHM: In Tuebingen.

60. Plotz, F. B., van Oeveren, W., Hultquist, K. A., Miller, C., Bartlett, R. H., and Wildevuur, C. R. A Heparin-Coated Circuit Reduces Complement Activation and the Release of Leukocyte Inflammatory Mediators During Extracorporeal Circulation in a Rabbit. *Artif.Organs* 1992;16(4):366-70.
61. Pradhan, M. J., Fleming, J. S., Nkere, U. U., Arnold, J., Wildlevuur, C. R., and Taylor, K. M. Clinical Experience With Heparin-Coated Cardiopulmonary Bypass Circuits. *Perfusion* 1991;6(3):235-42.
62. Redmond, J. M., Gillinov, A. M., Stuart, R. S., Zehr, K. J., Winkelstein, J. A., Herskowitz, A., Cameron, D. E., and Baumgartner, W. A. Heparin-Coated Bypass Circuits Reduce Pulmonary Injury. *Ann.Thorac.Surg.* 1993;56(3):474-8.
63. Rinder-CS, Bonan-J, Rinder-H, Mathew-, Hines-, and Smith-BR. Cardiopulmonary Bypass Induces Leukocyte-Platelet Adhesion. *Blood.* 1992;79:1201-5LHM: Diese Zeitsch.
64. Rostaing, L., Peres, C., Tkaczuk, J., Charlet, J. P., Bories, P., Durand, D., Ohayon, E., de Preval, C., and Abbal, M. Ex Vivo Flow Cytometry Determination of Intracytoplasmic Expression of IL-2, IL-6, IFN-Gamma, and TNF-Alpha in Monocytes and T Lymphocytes, in Chronic Hemodialysis Patients. *Am.J.Nephrol.* 2000;20(1):18-26.
65. Sao, M., Perttila, J., Pulkki, K., Gronroos, J., Mertsola, J., Peltola, O., and Nevalainen, T. Proinflammatory Mediator Response in Coronary Bypass Surgery Using a Centrifugal or a Roller Pump. *J.Extra.Corpor.Technol.* 1995;27(3):146-51.
66. Schwartz, J. D., Shamamian, P., Schwartz, D. S., Grossi, E. A., Jacobs, C. E., Steiner, F., Minneci, P. C., Baumann, F. G., Colvin, S. B., and Galloway, A. C. Cardiopulmonary Bypass Primes Polymorphonuclear Leukocytes. *J.Surg.Res.* 1998;75(2):177-82.
67. Silva, J., Jr., Hoeksema, H., and Fekety, F. R., Jr. Transient Defects in Phagocytic Functions During Cardiopulmonary Bypass. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1974;67(2):175-83.
68. Steinberg-BM, Grossi-E, Schwartz-D, McLoughlin-D, Aguinaga-, Bizekis-, Greenwald-, Flisser-, Spencer-F, Galloway-A, and et-al. Heparin Bonding of Bypass Circuits Reduces Cytokine Release During Cardiopulmonary Bypass. *Ann-Thorac-Surg.* 1995;60:525-9LHM: Diese Zeitsch.
69. Steinhausen, M. Blutkreislauf - Allgemeine Grundlagen. *Medizinische Physiologie.* Heidelberg: Verlag für Medizin; 1991. pp.79-87.
70. Stringer-HA, van-Swieten-, Heijnen-H, Sixma-J, and Pannekoek-H. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Released From Activated Platelets Plays a Key Role in Thrombolysis Resistance. Studies With Thrombi Generated in the Chandler Loop. *Arterioscler-Thromb.* 1994;14:1452-8LHM: Diese Zeitsch.

71. Taggart, D. P., Bakkenist, C. J., Biddolph, S. C., Graham, A. K., and McGee, J. O. Induction of Myocardial Heat Shock Protein 70 During Cardiac Surgery. *J.Pathol.* 1997;182(3):362-6.
72. Tarnok, A., Bocsi, J., Rossler, H., Schlykow, V., Schneider, P., and Hamsch, J. Low Degree of Activation of Circulating Neutrophils Determined by Flow Cytometry During Cardiac Surgery With Cardiopulmonary Bypass. *Cytometry* 15-2-2001;46(1):41-9.
73. Tayama, E., Hayashida, N., Akasu, K., Kosuga, T., Fukunaga, S., Akashi, H., Kawara, T., and Aoyagi, S. Biocompatibility of Heparin-Coated Extracorporeal Bypass Circuits: New Heparin Bonded Bioline System. *Artif.Organs* 2000;24(8):618-23.
74. te, Velthuis H., Jansen, P. G., Hack, C. E., Eijnsman, L., and Wildevuur, C. R. Specific Complement Inhibition With Heparin-Coated Extracorporeal Circuits. *Ann.Thorac.Surg.* 1996;61(4):1153-7.
75. Terstappen, L. W., Meiners, H., and Loken, M. R. A Rapid Sample Preparation Technique for Flow Cytometric Analysis of Immunofluorescence Allowing Absolute Enumeration of Cell Subpopulations. *J.Immunol.Methods* 1989;123(1):103-12.
76. Thiele, DL and Lipsky, PE. The Action of Leucyl-Leucine Methyl Ester on Cytotoxic Lymphocytes Requires Uptake by a Novel Dipetide-Specific Facilitated Transport System and Dipeptidyl Peptidase I-Mediated Conversion to Membranolytic Products. *J.Exp.Med.* 1990;172:183-94.
77. Toft, P., Christiansen, K., Tonnesen, E., Nielsen, C. H., and Lillevang, S. Effect of Methylprednisolone on the Oxidative Burst Activity, Adhesion Molecules and Clinical Outcome Following Open Heart Surgery. *Scand.Cardiovasc.J.* 1997;31(5):283-8.
78. Toft, P., Krog, J., Brix-Christensen, V., Beck, J., Dagnaes-Hansen, F., Obel, N., Bendix-Hansen, K., and Jorgensen, H. S. The Effect of CVVHD and Endotoxin on the Oxidative Burst, Adhesion Molecules and Distribution in Tissues of Granulocytes. *Intensive Care Med.* 2000;26(6):770-5.
79. Ulich, T. R., del Castillo, J., Keys, M., Granger, G. A., and Ni, R. X. Kinetics and Mechanisms of Recombinant Human Interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Changes in Circulating Numbers of Neutrophils and Lymphocytes. *J.Immunol.* 15-11-1987;139(10):3406-15.
80. van-der-Kamp-KW and van-Oeveren-W. Factor XII Fragment and Kallikrein Generation in Plasma During Incubation With Biomaterials. *J-Biomed-Mater-Res.* 1994;28:349-52LHM: In Tuebingen.
81. Videm, V., Nilsson, L., Venge, P., and Svennevig, J. L. Reduced Granulocyte Activation With a Heparin-Coated Device in an in Vitro Model of Cardiopulmonary Bypass. *Artif.Organs* 1991;15(2):90-5.

82. Watanabe, H., Hayashi, J., Ohzeki, H., Moro, H., Sugawara, M., and Eguchi, S. Biocompatibility of a Silicone-Coated Polypropylene Hollow Fiber Oxygenator in an in Vitro Model. *Ann.Thorac.Surg.* 1999;67(5):1315-9.
83. Watson, J.V. Enzyme Kinetic Studies in Cell Populations Using Fluorogenic Substrates and Flow Cytometric Techniques. *Cytometry* 1980;1:143-51.
84. Weber, N., Wendel, H. P., and Ziemer, G. Gene Monitoring of Surface-Activated Monocytes in Circulating Whole Blood Using Duplex RT-PCR. *J.Biomed.Mater.Res.* 2001;56(1):1-8.
85. Weiss, S.J. Tissue Destruction by Neutrophiles. *N.Engl.J.Med.* 1989;320:365-76.
86. Wendel, H. P., Jones, D. W., and Gallimore, M. J. FXII Levels, FXIIa-Like Activities and Kallikrein Activities in Normal Subjects and Patients Undergoing Cardiac Surgery. *Immunopharmacology* 1999;45(1-3):141-4.
87. Wendel, H. P., Weber, N., and Ziemer, G. [Comparative Studies of the Adsorption Behavior of Plasma Proteins to Heparin-Coated Surfaces]. *Biomed.Tech.(Berl)* 2000;45(10):282-7.
88. Wetterer, E. Bau und Funktion des Gefäßsystems. *Physiologie.* Stuttgart: Thieme; 1985. p.6.20-6.57.
89. White-Owen, C., Alexander, J. W., and Babcock, G. F. Reduced Expression of Neutrophil CD11b and CD16 After Severe Traumatic Injury. *J.Surg.Res.* 1992;52(1):22-6.
90. White-Owen, C., Hartmann, S., Alexander, J. W., and Babcock, G. F. Reduced PMN Beta 2 Integrins After Trauma: a Possible Role for Colony-Stimulating Factors. *Clin.Exp.Immunol.* 1993;92(3):477-81.
91. Yamada, H and Kudoh, I. Heparin-Coated Circuits Reduce the Formation of TNF-Alpha During Cardiopulmonary Bypass. *Acta Anaesthesiologica* 1996;40:311-7.

Danksagung

Prof. Dr. G. Ziemer

für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Einrichtungen des klinischen Forschungslabors.

Dr. Hans-Peter Wendel

für die kompetente Betreuung der Arbeit, das entgegengebrachte Vertrauen, seine herzliche Art bei der Zusammenarbeit und für die Korrektur der Dissertation.

Den Mitarbeitern des klinischen Forschungslabors der THG-Chirurgie

für die freundliche und fröhliche Arbeitsatmosphäre im Labor und die Tips und Tricks von allen Seiten.

Prof. Dr. Northoff und den Mitarbeitern der Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Tübingen

für die Möglichkeit der Nutzung des Coulter Epics XL-Durchflußzytometers in den Räumen der Transfusionsmedizin zu jeder Tag- und Nachtzeit und die Unterstützung.

Prof. Dr. K.Dietz, Instiut für Biometrie und med. Informatik

für die Hilfestellung bei den statistischen Auswertungen.

Dr. Axmann, Instiut für Biometrie und med. Informatik, Aussenstelle ZMK

für die Hilfe bei der Formulierung der Fragestellungen und die Skizzierung des Auswertungsvorgehens, sowie den entscheidenen Hinweisen für die statistische Auswertung.

Lebenslauf

Name Nils Hauser
Geburtsdatum & Ort 1. Juli 1971, Tübingen
Familienstand verheiratet

Schulbildung

1978 – 1982 Melanchthon-Grundschule, Tübingen
1982 – 1991 Wildermuth-Gymnasium, Tübingen
1991 Abitur (Leistungskurse: Englisch, Deutsch)

Hochschulausbildung

04/1993 – 05/2001 Medizinstudium an der Eberhard-Karls Universität
Tübingen
08/1996 Ärztliche Vorprüfung
04/1997 Erstes Staatsexamen
04/1999 Zweites Staatsexamen
04/2000 – 04/2001 Praktisches Jahr an den Städt. Kliniken Esslingen /
Universität Tübingen
05/2001 Drittes Staatsexamen

Zivildienst

08/1991 – 12/1992 Zivildienst beim Rettungsdienst des DRK, Tübingen

Famulaturen

03/1995 - 04/1995 Famulatur Innere Aufnahmestation, Medizinische
Universitätsklinik, Tübingen
08/1996 - 09/1996 Famulatur Innere Notaufnahme der Medizinischen
Universitätsklinik, Tübingen
07/1997 - 08/1997 Famulatur in der Abt.für Anästhesie der Universität Tübingen
08/1998 - 10/1988 Praxis-Famulatur Dr.med. Welz, Tübingen,

Beschäftigung

seit 08/2001 AIP in der Abt. für Anästhesiologie und operative Intensiv-
medizin, CA PD Dr. med U. Bissinger, Städt. Kliniken Esslingen
a.N.

Ostfildern den 1. Januar 2003